

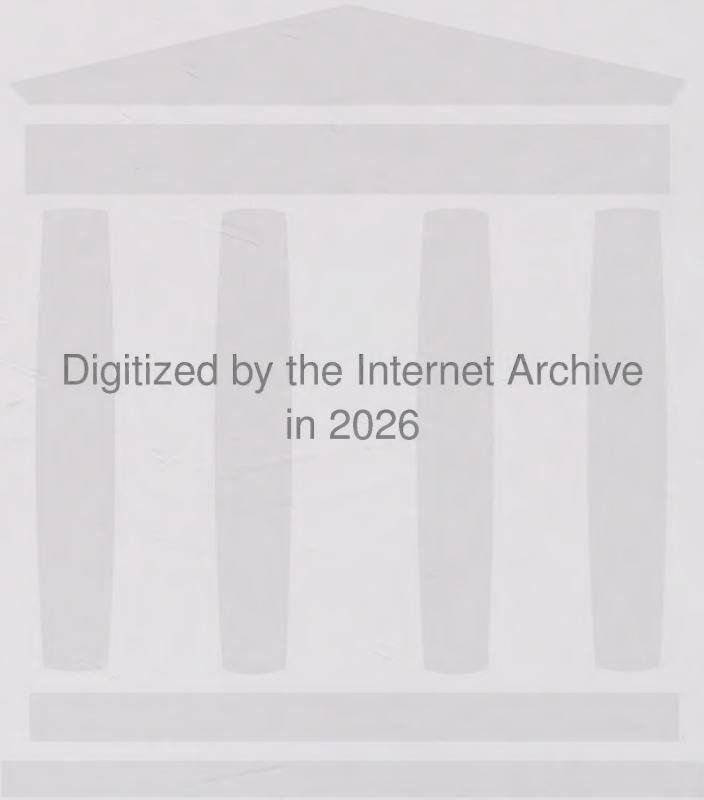
Charakterisierung von Autoantikörpern gegen
den Adeninnukleotidtranslokator der inneren mitochondrialen Membran bei
Patienten mit Myokarditis und Dilativer Kardiomyopathie

Peter L. Schwimbeck

aus

München

1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0042

Aus der Medizinischen Klinik I am Klinikum Großhadern der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

Charakterisierung von Autoantikörpern gegen
den Adeninnukleotidtranslokator der inneren mitochondrialen Membran bei
Patienten mit Myokarditis und Dilativer Kardiomyopathie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter L. Schwimmbeck

aus
München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. H.-D. Bolte

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. G. Riecker

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 85

<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Material und Methoden</u>	6
II.1. Material	6
II.1.1. Chemikalien	6
II.1.2. Radioaktive Substanzen	7
II.1.3. Geräte	7
II.2. Methoden	8
II.2.1. Isolierung des ANT als CAT-Protein-Komplex	8
II.2.1.1. Isolierung des ANT aus dem Herzen	8
II.2.1.2. Isolierung des ANT aus der Leber	11
II.2.1.3. Isolierung des ANT aus der Niere	12
II.2.2. Solid-phase-radioimmunoassay	15
II.2.3. Absorptionsstudien	16
II.2.3.1. Absorption von Antikörpern an Mitochondrien	16
II.2.3.2. Absorption am isoliertem ANT aus Herz und Leber	20
II.2.4. Bindungsstudien mit spezifischen Liganden	22
II.2.4.1. Bindungsstudien mit dem spezifischen Liganden CAT	22
II.2.4.2. Bindungsstudien mit dem spezifischen Liganden BKA	23
II.2.5. Beeinflussung des Adenin-Nukleotid-Austausches	24
II.2.5.1. Messung des Adenin-Nukleotid-Austausches an Mitochondrien aus Herz, Leber und Niere	24
II.2.5.2. Messung des Adenin-Nukleotid-Austausches an submitochondrialen Partikeln	29
II.2.6. Aufbereitung der Seren	30

II.2.7.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	31
II.3.	Patienten	32
<u>III.</u>	<u>Ergebnisse</u>	39
III.1.	Der Adeninnukleotidtranslokator als organspezifisches Autoantigen	39
III.1.1.	Bindung der Antikörper am ANT	39
III.1.2.	Absorptionsstudien	43
III.2.	Hemmung der spezifischen Liganden CAT und BKA	51
III.3.	Organ- und konformationsspezifische Hemmung der Funktion des ANT	54
III.4.	Antikörper, die ein "leakage" am ANT verursachen	66
<u>IV.</u>	<u>Diskussion</u>	70
IV.1.	Auftreten von organ- und konformationsspezifischen Antikörpern gegen den ANT	70
IV.2.	Korrelation zwischen Antikörpertiter und klinischem Schweregrad der Erkrankung	76
IV.3.	Bedeutung der Antikörper gegen den ANT bei DCM und MC	79
<u>V.</u>	<u>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</u>	83
<u>VI.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	84
<u>VII.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	99

I. Einleitung

Die Dilative Cardiomyopathie (DCM) ist definitionsgemäß eine Herzmuskelerkrankung unbekannter Genese (38,80). Als mögliche Faktoren, die ein Auftreten der DCM begünstigen, wurden langer und hoher Alkoholkonsum, Bluthochdruck, Schwangerschaft und virale Infektionen diskutiert (1,19,34,44,45). Ob und inwieweit diese Faktoren bei der Entstehung der DCM eine Rolle spielen, konnte jedoch bisher nicht endgültig geklärt werden. In den letzten Jahren mehrten sich solche Befunde, die darauf hindeuten, daß die Virusmyokarditis möglicherweise einen entscheidenden ätiologischen Faktor für die Entstehung der DCM darstellt (39,43,47,108). So konnte im Tiermodell an Mäusen gezeigt werden, daß eine durch das EMC-Virus hervorgerufene Myocarditis (MC) in ein chronisches Stadium übergehen und bis zum Bild der DCM fortschreiten kann (72). Desweiteren konnte man im Serum von Patienten mit DCM hochtitrig Antikörper der IgM-Klasse gegen Coxsackie-Viren in einem sehr viel höheren Prozentsatz nachweisen, als dies in den Seren eines gesunden Kontrollkollektivs möglich war (18). Daneben berichten mehrere klinische Fallbeschreibungen vom bioptischen Nachweis einer MC bei dem klinischen Bild einer DCM (29,79,84). Außerdem legen Berichte vom Übergang einer histologisch gesicherten MC in eine histologisch gesicherte DCM einen Zusammenhang zwischen einer akuten Virusmyokarditis und der DCM nahe (67). Über die möglichen Pathomechanismen hierfür herrscht noch Unklarheit und sie sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Bisherige Untersuchungen nennen eine direkte Schädigung des Myokards durch die Virusinfektion, eine opportunistische Virusinfektion des schon vorgeschädigten Herzens oder aber eine virale Infektion, die im Sinne einer Triggerung einen

autoimmunologischen Prozeß gegen das Myokard in Gang setzt, als mögliche Erklärung für die gefundene Koinzidenz von viraler Infektion, histologisch gesicherter MC und der Manifestation einer DCM (19,36). Die DCM könnte somit als Spätkomplikation bei einer MC angesehen werden.

Inwieweit das Immunsystems an der Pathogenese der DCM beteiligt ist, wird noch kontrovers diskutiert. Mehrere Veröffentlichungen berichten, daß bei Patienten mit DCM eine verminderte Aktivität der Suppressor-T-Zellen vorliegt (24,31). Weitere Befunde weisen auf eine genetische Prädisposition hin, die sich in einer positiven Korrelation mit bestimmten HLA-Genen, die mit einer niedrigen Suppressorzellaktivität assoziiert sind, äußert (25). Als weiteres Indiz für das Vorliegen eines autoimmunologischen Prozesses spricht der Nachweis von Autoantikörpern gegen verschiedene Strukturen des Myokards bei Patienten mit DCM. Diese Antikörper sind z.T. muskelspezifisch, zeigen eine Kreuzreaktion mit viralen Proteinen oder haben eine zytolytische Aktivität. Auch wurde eine durch Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität gefunden (52,69,70,71).

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe waren mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen neben antisarcolemmalen, antimyofibrillären und antinukleären Antikörpern auch antimitochondriale Antikörper bei Patienten mit DCM und MC nachweisbar (13,14). In weiterführenden Untersuchungen konnte der Adeninnukleotidtranslokator (ANT) der inneren mitochondrialen Membran, das mengenmäßig am häufigsten vorliegende mitochondriale Membranprotein, als organspezifisches Auto-Antigen bei autoimmunologischen Erkrankungen, wie z.B. der Primär Biliären Zirrhose (PBC), identifiziert, isoliert und immunchemisch

charakterisiert werden (88,89,90,91,92,93,96).

Der ANT (55,60,95) kommt in der inneren mitochondrialen Membran von aerob lebenden Eukaryontenzellen vor. Er hat die Aufgabe, das in den Mitochondrien synthetisierte ATP über die innere mitochondriale Membran zu den energieverbrauchenden Prozessen im Zytosol zu transportieren und den Rücktransport von ADP in die Mitochondrien zur Rephosphorylierung zu übernehmen, da die innere mitochondriale Membran a priori für ADP und ATP impermeabel ist. Der ADP/ATP-Transport läuft als 1:1 Gegen Austausch von ADP bzw. ATP ab und ist hoch spezifisch für diese beiden Adennukleotide. Die Kontrolle des ADP/ATP-Austausches erfolgt durch das Membran- bzw. Phosphorylierungspotential, wodurch der ADP/ATP-Transport genau den Erfordernissen des Energiebedarfes der Zelle angepaßt ist (78).

Eine wesentliche Voraussetzung für die funktionelle und proteinchemische Charakterisierung des ANT war die Entdeckung der spezifischen Liganden Carboxyatractylat (CAT) und Bongkrekat (BKA), welche beide spezifisch am ANT binden (54). Beide Liganden unterscheiden sich jedoch dadurch, daß sie an verschiedenen Bindungsstellen angreifen. So bindet CAT nur von der cytosolischen Seite am ANT, während BKA nur an der der Mitochondrienmatrix zugewandten Seite der Membran binden kann. Entsprechend der Ausrichtung dieser Ligandenbindungsstelle unterscheidet man zwei verschiedene Konformationszustände des ANT: In der sog. "c"-Konformation ist die Ligandenbindungsstelle nach "aussen", zur cytosolischen Seite der Membran hin ausgerichtet, sodaß CAT am ANT binden kann. Hierdurch wird das Protein in dieser Konformation fixiert. In der sog. "m"-Konformation dagegen ist die Substratbindungsstelle nach "innen", zur Matrixseite hin,

ausgerichtet. Diese Konformation wird durch die Bindung von BKA am ANT fixiert. Beim Transport von ADP bzw. ATP über die innere mitochondriale Membran kommt es zu einer Konformationsänderung, wobei die beiden Konformationszustände ineinander übergehen. Man vermutet, daß es sich dabei um einen "gated-pore"-Mechanismus handelt (54).

Der ANT kann aus der inneren mitochondrialen Membran mit nicht-ionischen Detergentien als CAT- bzw. BKA-Protein-Komplex herausgelöst und isoliert werden (57,59,81). Dabei zeigt sich, daß der ANT in der intakten Membran als Dimer, welches aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 30000 besteht, vorliegt (40). Der Anteil des ANT am mitochondrialen Membranprotein beträgt etwa 12 % bei Herzmitochondrien, 3 % bei Lebermitochondrien und etwa 4 % bei Nierenmitochondrien. In Rekonstitutionsversuchen mit dem isolierten ANT konnte gezeigt werden, daß das isolierte Protein mit einem Molekulargewicht von 60000 das gesamte Transportsystem für ADP bzw. ATP darstellt (62,63).

Immunologische Untersuchungen ergaben keine Hinweise für eine Speziesspezifität des ANT, hingegen konnte eine Organ- und Konformationsspezifität des ANT nachgewiesen werden (28). Isoliert man den ANT aus den Organen Herz, Leber und Niere, so zeigt sich zwar eine partielle Kreuzreaktivität zwischen den drei Proteinen, Immunsorptionsstudien belegen jedoch eindeutig das Vorhandensein organspezifischer antigenen Determinanten (85,86). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß diese Organspezifität zumindest teilweise durch den Translokationsapparat selbst bedingt ist. So konnte z.B. mit einem gegen das Herz-Protein gerichteten Antikörper nur eine Hemmung des Nukleotidtransportes an Herzmitochondrien, nicht jedoch an Leber- und Nierenmitochondrien erreicht werden. Der Nachweis

konformationsspezifischer antigener Determinanten gelang durch Bindungs- und Absorptionsstudien sowohl am isoliertem Protein, als auch an dem in der Membran befindlichen Protein. Auch hier zeigte sich, daß die für den Nukleotidtransport verantwortlichen Teile des Proteins neben der Organspezifität auch durch eine Konformationsspezifität charakterisiert sind (89,90).

Ausgehend von den oben dargestellten Befunden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Auto-Antikörper gegen den ANT bei Patienten mit DCM bzw. MC vorliegen, und ob auch andere Herzmuskelerkrankungen mit einer Antikörperbildung gegen den ANT einhergehen. Darüber hinaus sollten die Antikörper bezüglich ihrer Organ- und Konformationsspezifität sowie ihrer funktionellen Aktivität - d.h. ob sie zu einer Hemmung des Nukleotidtransportes bzw. zu einer Blockierung der Ligandenbindung führen - untersucht werden.



II. Material und Methoden

II.1. Material

Die verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bzw. Institutionen bezogen:

II.1.1. Chemikalien:

- ADP und ATP: Boehringer, Mannheim
- Bongkrekat: Institut für Physikalische Biochemie der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. M. Klingenberg)
- Carboxylatractylat: Boehringer, Mannheim
- Fetales Kälberserum: Gibco Europe, Karlsruhe
- Hydroxylapatit (HTP): Bio-Rad, München
- Mikrotiterplatten: Dynatech Products, Plochingen
- Staphylokokken, Stamm Cowan I: Institut für Genetik der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Kaudewitz)
- Szintillationsflüssigkeit: Zinsser, Frankfurt
- Triton X-100: Sigma, München
- Ultrogel ACA 34: Pharmacia, Freiburg

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

II.1.2. Radioaktive Substanzen:

- ¹⁴C-ADP: New England Nuclear (NEN), Dreieich
- ¹²⁵I-Protein A: NEN, Dreieich
- ³H-CAT und ³H-BKA: Institut für Physikalische Biochemie der
Universität München (Vorstand: Prof. Dr. M. Klingenberg)

II.1.3. Geräte

- Druckdialysekammer: Amicon, München
- Laborzentrifuge: du Pont Instruments (Sorvall), München
- Mixer: Braun, Frankfurt
- Tischzentrifuge: Eppendorf
- Ultraschall "cell disruptor": Branson, Schwäbisch Gmünd
- Ultrazentrifugen, Rotoren und Zentrifugenbecher: Beckmann, München

II.2. Methoden:

II.2.1. Isolierung des ANT als CAT-Protein-Komplex

II.2.1.1. Isolierung des ANT aus dem Herzen

Der ANT wurde nach der von Riccio et al. (81,82) beschriebenen Methode isoliert. Als Ausgangssubstanz wurden frische Rinderherzen vom Schlachthof geholt, in etwa 1 cm dicke Scheiben geschnitten und in 4°C kalten Puffer I (0.25 M Saccharose, 2 mM EGTA, pH: 7.4 mit KOH eingestellt) transportiert. Die Präparation und Isolierung wurde ausschließlich im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Während der Präparation wurden Endokard, Perikard, Bindegewebe und Gefäße verworfen. Der kleingeschnittene Herzmuskel wurde in Puffer I mehrmals gewaschen, wodurch Fett und Blut entfernt wurden. Anschließend wurde das Muskelgewebe durch einen Fleischwolf gedreht und 350 g Gewebe wurde in 3,5 Liter Puffer II (0.25 M Saccharose, 5 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH: 7.4) aufgenommen. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7.4 mit Tris wurde das Gewebe zunächst 1x 15 Sek. bei Stufe I und dann 2x 20 Sek. bei Stufe II gemixt. Nach erneutem Einstellen des pH-Wertes auf 7.4 erfolgte eine Zentrifugation der Herzmuskelsuspension in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) bei 1750 Umdrehungen pro Minute (Upm) (= 600 g). Der Überstand wurde durch eine 4-fache Schicht von Gaze abgossen, und anschließend nochmals bei 8000 Upm (= 11000 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer II aufgenommen, gepottert und abermals bei 1750 und 8000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in Puffer III (0.25 M Saccharose, 10 mM Mops, 2 mM MgCl₂, 50 µM ATP) aufgenommen und gepottert. Der Proteingehalt der

Mitochondriensuspension wurde nach der Methode von Biuret bestimmt (11). Um eine Denaturierung des ANT während der nachfolgenden Isolation mit Detergentien zu vermeiden, wurden die Mitochondrien vor der Auflösung mit Triton X-100 mit Hilfe des spezifischen Liganden ^3H -CAT beladen. Die Beladung des ANT mit ^3H -CAT dient neben der Stabilisierung des Proteins während der Isolierung auch der radioaktiven Markierung des Proteins. Dies erleichtert die Identifikation des Proteins nach den einzelnen Isolierungsschritten mit der Hydroxylapatit-(HTP)- bzw. Ultrogel-(ACA-34)-Säule und ermöglicht über die Berechnung der spezifischen Bindung eine Bestimmung des Reinheitsgrades des Proteins. Außerdem ist die Bindung von CAT ein sehr sensibler Indikator für die Intaktheit des Proteins, da der ANT nur im undenaturierten Zustand fähig ist, CAT zu binden. Als Ausgangsmenge für die Beladung mit CAT dienten 700 mg Mitochondrien. Die Beladung der Mitochondrien erfolgte mit 1.5 nM "kalten" CAT pro 1 mg Mitochondrien und ^3H -CAT entsprechend einer Menge von 1500 cpm/1 nM "kalten" CAT. Die Mitochondrien wurden zur Beladung 30 Minuten bei 4°C inkubiert in einer Konzentration von 20 mg/ml. Anschließend wurden die Mitochondrien mit Puffer III auf 350 ml verdünnt und bei 8000 Upm 10 Min. lang zentrifugiert. Die Aufnahme des Sediments erfolgte in Puffer IV (0.4 M Na_2SO_4 , 40 mM Mops, 0.2 mM EDTA, pH: 7.4 mit KOH eingestellt). Zur Auflösung der Mitochondrienmembran wurden die Mitochondrien (700 mg) in folgendes Medium überführt: 10 ml Puffer IV, 14 ml Triton X-100 (20%ige Lösung), H_2O ad 40 ml Gesamtvolumen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurde der Ansatz 40 Min. bei 40000 Upm (= 140000 G) in der Ultrazentrifuge (Rotor: Ti 60) zentrifugiert. Der Überstand (400 mg Protein) wurde auf eine HTS-Säule (Volumen: 240 ml) aufgetragen. Der

Durchlaufpuffer bestand aus 100 mM Na_2SO_4 , 10 mM Mops, 0.05 mM EDTA und 0.5% TX-100. Bei einer Durchflußrate der Säule von 50 ml/Stunde wurden Fraktionen von 5 ml Größe gesammelt. Von den Fraktionen, die erfahrungsgemäß den ANT enthielten (ab 50% des Säulenvolumens) wurde der Proteingehalt nach der Methode von Lowry (66) bestimmt, sowie die Radioaktivität gemessen. Aus dem Proteingehalt und dem Gehalt an ^3H -CAT in den Durchlauf fraktionen läßt sich dann die jeweilige Anreicherung des Proteins durch die Berechnung der spezifischen Bindung bestimmen:

$$\text{spez. Bindung} = \frac{\text{Aktivität der Probe/Proteinmenge}}{\text{spezifische Aktivität}} \left[\frac{\text{nMol}}{\text{mg}} \right]$$

wobei sich die spezifische Aktivität folgendermaßen ergibt:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\text{Gesamtaktivität an } ^3\text{H-CAT}}{\text{Gesamtmenge an CAT}} \left[\frac{\text{cpm}}{\text{nMol}} \right]$$

Die Fraktionen mit den besten Bindungen - es wurden hier Bindungen bis zu 8 nMol/mg erreicht- wurden gepoolt. Nach Einengung der Probe auf ca. 20 ml mit Hilfe einer Druckdialyse, wurde diese Menge (Proteingehalt ca. 0,8 mg/ml) auf eine ACA-34-Säule aufgetragen. Das Gesamtvolumen der Säule betrug 482 ml, der Durchlaufpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 160 mM Na_2SO_4 , 10 mM Mops, 0.05 mM EDTA und 0.5% TX-100. Der Flow der Säule betrug 21 ml/Std. und es wurden Fraktionen von ca. 3.5 ml gesammelt. Von den Proben, die erfahrungsgemäß den ANT enthielten (ab 60% des Säulenvolumens) wurden wiederum Proteingehalt und Radioaktivität bestimmt und anschließend die spezifische Bindung berechnet.

Die theoretisch maximal erreichbare Bindung bei der Isolierung des ANT

aus dem Herzen ist 16 nmol CAT/mg Protein, es wurden hier Werte bis 14 nmol/mg erreicht.

Das Protein wurde während der einzelnen Isolierungsschritte in einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Lämmli (22,64) getestet. Nach dem letzten Reinigungsschritt bestand das getestete Protein nur noch aus einer Bande.

II.2.1.2. Isolierung des ANT aus der Leber

Der ANT wurde im Prinzip aus der Leber nach der gleichen Methode isoliert wie aus Herzmuskelgewebe. Es wurden die gleichen Puffer verwendet, die abweichenden Isolierungsschritte sollen hier genannt werden:

Das Hauptproblem der Isolierung des ANT aus Lebergewebe besteht in der hohen Labilität des CAT-Protein-Komplexes, was möglicherweise durch den höheren Proteasengehalt der Leber erklärbar ist. Es ist daher notwendig, daß die Isolierung möglichst schnell erfolgt, um eine Proteolyse des ANT zu verhindern.

Wegen der weichen Konsistenz der Leber war eine Zerkleinerung mit dem Fleischwolf nicht nötig. Das Gewebe wurde möglichst klein geschnitten und kräftig in Puffer I gewaschen. Die weitere Zerkleinerung erfolgte mit dem Mixer für 1 x 7 sec bei Stufe I und 2 x 10 sec bei Stufe II. Die Zentrifugation (Rotor: SS 3) erfolgte das erste Mal bei 1750 U_{pm} (= 600 g), der Überstand wurde nochmals verdünnt und abermals bei 1750 U_{pm} zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 8000 U_{pm} (= 11000 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde zur Beladung verwendet. Die

Beladung erfolgte mit 0.3 nM "kaltem" CAT pro 1 mg mitochondriales Protein und ^3H -CAT entsprechend einer Menge von 1500 cpm pro 1 nM "kaltem" CAT. Bei der HTP-Säule wurde ein Volumen von 300 ml pro 700 mg beladene Mitochondrien gewählt.

Auch hier wurde die spezifische Bindung der Durchlaufaktionen aus dem Proteingehalt und der Radioaktivität der Proben nach den einzelnen Isolationschritten bestimmt. Als typisches Beispiel sind die Werte nach der ACA-34-Säule einer Isolierung in Abb.: II.1. angegeben.

II.2.1.3. Isolierung des ANT aus der Niere

Im Prinzip entsprach die Isolierung des ANT aus der Niere wieder der aus dem Herzmuskel. Davon abweichend war:

Bei der Präparation wurde nur Nierenrinde verwendet, kein Nierenmark. Bindegewebe, Gefäße und die Nierenkapsel wurden verworfen. Es folgte wieder Kleinschneiden mit dem Messer und Mixen analog der Präparation aus dem Herzmuskel. Die Beladung erfolgte mit 0.6 nM "kaltem" CAT pro 1 mg mitochondrialem Protein und ^3H -CAT entsprechend einer Menge von 1500 cpm pro 1 nM "kaltem" CAT. Die übrigen Isolationschritte verliefen wie bei der Isolierung des ANT aus dem Herzen.

Es wurden auch hier wieder Proteingehalt und Radioaktivität der Durchlaufproben bestimmt und daraus die spezifische Bindung berechnet. Ein typisches Beispiel für diese Werte nach der ACA-34-Säule ist in Abb.: II.2. gegeben.

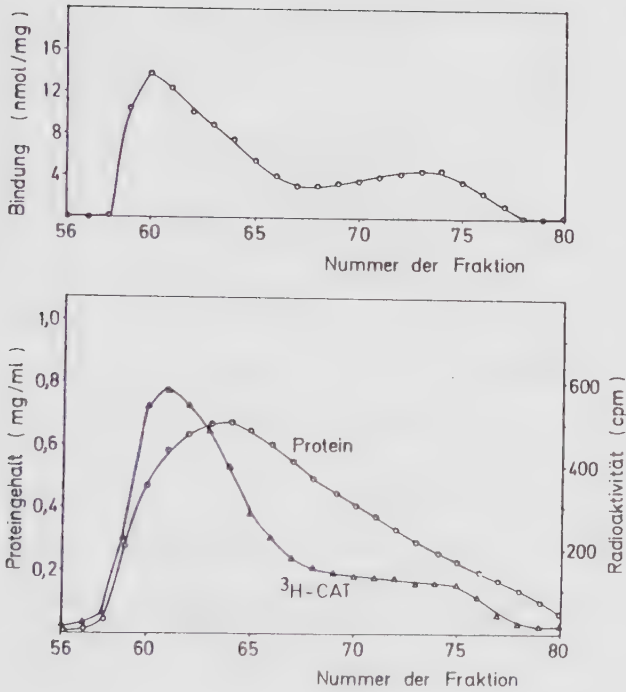


Abb. II.1.: Proteingehalt, Radioaktivität und spezifische Bindung der Durchlaufaktionen nach der ACA-34-Säule bei der Isolierung des ANT aus der Leber.

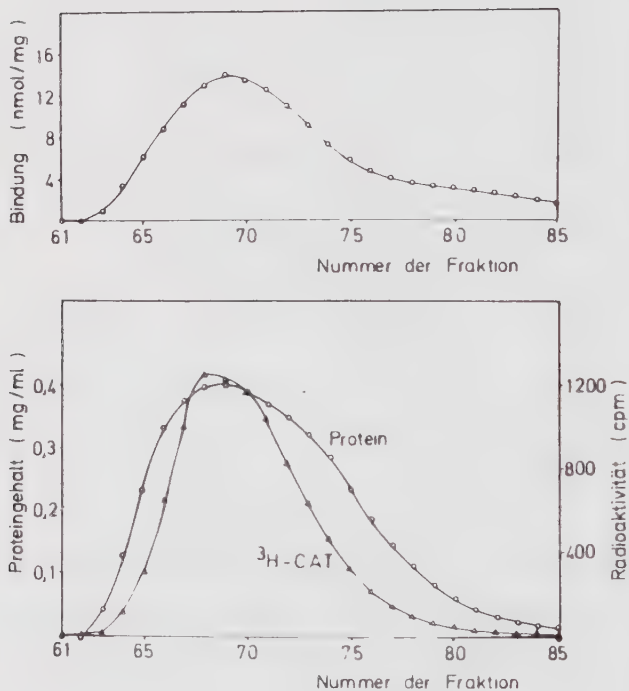


Abb. II.2.: Proteingehalt, Radioaktivität und spezifische Bindung der Durchlaufaktionen nach der ACA-34-Säule bei der Isolierung des ANT aus der Niere.

II.2.2. Solid-phase-radioimmunoassay

Die Bindung der Antikörper am isolierten ANT aus den drei Organen Herz, Leber und Niere wurden mit einem Solid-phase-radioimmunoassay (SPRIA) gemessen (99). Als Antigen wurde dabei eine Lösung des ANT aus einem der drei Organe in 160 mM Na_2SO_4 , 10 mM Mops, 0.05 mM EDTA und 0.5% Triton X-100 verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 0.5 mg/ml. Es wurden Aliquots von 90 μl auf u-förmige Mikrotiterplatten aus Polyvinyl, die die Eigenschaft haben, daß sich Proteine gut an ihre Oberfläche binden, aufgetragen. Die Mikrotiterplatten wurden während der Inkubation des Proteins auf Eis gestellt, um ein Erwärmen und damit Denaturierung des Antigens zu verhindern. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4°C wurde das Antigen abpipettiert und es folgte ein erster Waschvorgang mit 50 μl eines Phosphatpuffers (= phosphate bufferes saline = PBS), der 3% fetales Kälberserum (=FKS), enthielt. Im 2. und 3. Waschvorgang wurden 100 μl des gleichen Waschmediums (3% FKS in PBS) verwendet. Bei dem 3. Waschvorgang wurde der Waschpuffer für 1 Stunde auf der Platte belassen, um so noch freie, nicht mit Antigen besetzte Bindungsstellen auf der Platte zu blockieren. Es sollte dadurch eine unspezifische Bindung der Antikörper an den Platten verhindert werden. Im Anschluß an das Absaugen des Waschpuffers wurden die Platten umgedreht und leicht auf Papier ausgeklopft, um möglichst die ganze Waschlösung zu entfernen. Es folgte dann das Auftragen der zu testenden Seren. Diese wurden mit dem Waschpuffer je nach gewünschter Verdünnungsstufe verdünnt. Die Patientenseren wurden bei einer Verdünnungsstufe von 1:10 untersucht. Es wurden je 80 μl des 1:10 verdünnten Serums aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am anderen Morgen

wurde das Serum abgesaugt und die Platten mit 50 μ l sowie anschließend mit 2 x 100 μ l PBS gewaschen. Nach dem 2. und 3. Waschvorgang wurden die Platten wieder abgeklopft. Die gebundenen Antikörper wurden nun durch die Hinzugabe von ^{125}J -Protein A (35,65) bestimmt. Es wurden 75 μ l ^{125}J -Protein A in PBS mit einer Aktivität von 100000 cpm aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde der Tracer abgesaugt, die Platten 3x in gewohnter Weise gewaschen, getrocknet und anschließend wurde bei jeder Probe einzeln im gamma-Zähler die Radioaktivität bestimmt. Es wurden alle Bestimmungen mit Doppelwerten durchgeführt. Als Kontrollwerte wurden jeweils eine Probe ohne Serum, eine Probe ohne Antigen und eine Probe mit einem Kontrollserum mitgetestet. Die Höhe der gemessenen Radioaktivität in der Probe ist proportional der Menge der Antikörper, die am Antigen auf den Mikrotiterplatten gebunden sind. Die Menge der gebundenen Antikörper ist wiederum proportional ihrer Konzentration im Serum, also dem Antikörpertiter. Die Höhe der Radioaktivität und damit der Antikörpertiter im Serum sind titrierbar. Ein typisches Beispiel dafür zeigt die Abb. II.3..

II.2.3. Absorptionsstudien

II.2.3.1. Absorption von Antikörpern an Mitochondrien

Als Absorptionsmedien wurden isolierte Mitochondrien von Rinderherzen bzw. Kälberlebern verwendet. Die Isolierung ist in Abschnitt II.2.1.1. bzw. II.2.1.2. beschrieben. Die Mitochondrien wurden bis zur Verwendung bei -40°C gelagert. Die Versuche wurden bei 4°C mit

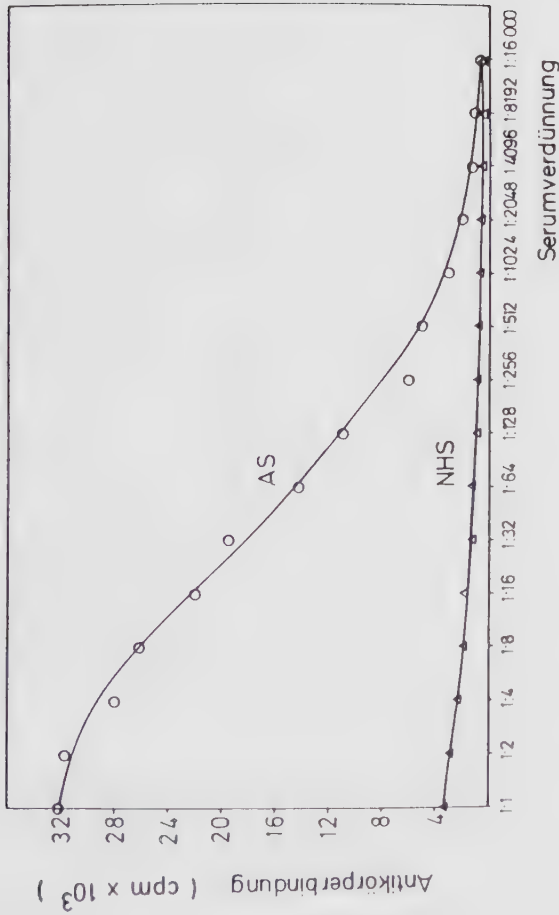


Abb. II.3.: Höhe der Antikörperbindung in Abhängigkeit von der Serumverdünnung

einer Proteinkonzentration von 5,0 mg/ml (Puffer : 0.25 M Saccharose, 5 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH 7.4) durchgeführt. Von der Mitochondriensuspension wurden je 100 μ l (= 0.5 mg Protein) mit 30 μ l des zu testenden Serums bei 4⁰C 10 Stunden lang inkubiert. Dabei wurden die Proben laufend gemischt, so daß sich die Mitochondrien in der Suspension nicht am Boden absetzen konnten. Anschließend wurden die Mitochondrien in einer Tischzentrifuge bei 8500 g abzentrifugiert und 100 μ l des Überstandes entnommen. Nach Zugabe von 100 μ l Puffer zu dem Sediment wurden die Mitochondrien durch Pottern resuspendiert und abermals bei 8500 g abzentrifugiert. Es wurden erneut 100 μ l des Überstandes entnommen und zum ersten Überstand gegeben. Nach einem nochmaligem Waschvorgang mit 100 μ l Puffer wurden wieder 100 μ l Überstand mit den schon gesammelten 200 μ l vereinigt. Dieser 2-malige Waschvorgang ist nötig, um nur unspezifisch an den Mitochondrien gebundene Antikörper zu eluieren und somit falsch hohe Absorptionsraten zu vermeiden. Die Vereinigung der Überstände ergab ein standardisiertes Gesamtvolumen von 300 μ l bei einer eingesetzten Serummenge von 30 μ l. Dies entsprach einer Serumendverdünnung von 1:10. Die Menge der noch im Überstand vorhandenen Antikörper wurde mit dem Solid-phase-radioimmunoassay bestimmt (siehe II.2.2.), wobei immer auch eine Probe des Serums vor Absorption, in gleicher Verdünnung (1:10), mitgetestet wurde. Die verwendete Menge von 0.5 mg Mitochondrien pro 30 μ l Serum wurde gewählt, da Vorversuche mit verschiedenen Mengen von Mitochondrien gezeigt hatten, daß eine höhere Antigenmenge auch bei hoher Antikörperaktivität zu keiner weiteren Absorption führte, man sich also im Sättigungsbereich bezüglich des Antigenangebotes befand. Eine typische Kurve für das Ausmaß der Absorption in Abhängigkeit von der Mitochondrienmenge zeigt Abb.

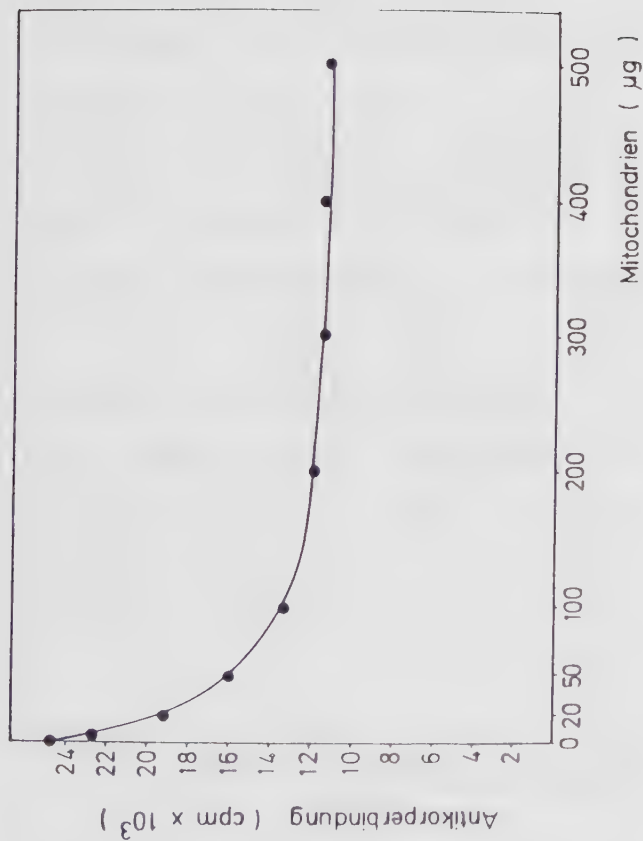


Abb. II.4.: Höhe der Antikörperbindung am ANT nach Absorption des Serums (30ul) an verschiedenen Mengen von Mitochondrien.

II.4.. Eine größere Menge des Absorptionsmaterials als 0.5 mg Protein/30 μ l Serum führte zu keiner signifikanten Zunahme der Antikörperabsorption. Die weitere geringe Abnahme der Restaktivität entspricht einer unspezifischen Bindung der Antikörper an den Mitochondrien. Die Inkubationszeit betrug 10 Stunden, um den Antikörpern so eine vollständige Bindung an den Mitochondrien zu ermöglichen.

Als Inkubationstemperatur wurde 4°C gewählt, jedoch zeigten Versuche, daß eine höhere Inkubationstemperatur von 20°C (= Raumtemperatur) zu keinen signifikant anderen Ergebnissen führte. Da jedoch eine Denaturierung der Mitochondrien und damit eine unspezifische Bindung der Antikörper sicher vermieden werden sollte, wurde eine Inkubationstemperatur von 4°C beibehalten.

Um eine unspezifische Bindung und damit Absorption der Antikörper an den Mitochondrien auszuschließen, wurden Vorversuche mit Inkubationsmedien, die 0.1, 0.5, bzw. 1.0% Triton X-100 enthielten, durchgeführt. Da sich die Ergebnisse mit und ohne Triton X-100 nicht signifikant unterschieden, wurde auf die Zugabe von Triton X-100 verzichtet.

II.2.3.2. Absorption am isolierten ANT aus Herz und Leber

Als Absorptionsmaterial wurde isolierter ANT aus Herz und Leber verwendet. Es wurde darauf geachtet, daß vor allem der ANT aus der Leber erst unmittelbar vorher isoliert worden war, da der CAT-Protein-Komplex der Leber relativ instabil ist und auch im Kühlschrank nur kurzzeitig ohne Denaturierung gelagert werden kann. Es

wurde eine Ausgangskonzentration des ANT von 0.5 mg/ml verwendet. Nach Verteilung auf Proben von 100 μ l wurden 30 μ l des zu testenden Serums hinzugegeben und die Ansätze bei 4°C für 10 h inkubiert. Dabei wurde auf eine dauernde, gute Durchmischung der Ansätze geachtet. Anschließend wurden zu den Proben je 40 μ l einer Suspension von *Staphylococcus aureus* des Stammes Cowan I (10mg/ml) zugegeben. Die Staphylokokken des Stammes Cowan I haben die Eigenschaft, sich an Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden, jedoch nicht an freie Antikörper (49,50). Bei dieser Versuchsanordnung wurden dann die an das Antigen gebundenen Antikörper als Bakterien-Antigen-Antikörper-Komplexe abzentrifugiert. Die nicht absorbierten Antikörper im Überstand konnten anschließend im Radioimmunoassay auf ihre Restaktivität hin getestet werden. Die Menge von 400 μ g Bakterienprotein/Ansatz lag weit im Sättigungsbereich, wie mit entsprechenden Verdünnungsreihen überprüft wurde. Die Inkubationszeit mit den Bakterien betrug 20 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 20°C. Anschließend wurden die Ansätze bei 8500 g abzentrifugiert und vom Überstand 100 μ l abgehoben. Nach Zugabe von 100 μ l Puffer (250 mM Saccharose, 5 mM Tris/HCL, 1mM EDTA, pH 7.4) wurde das Sediment durch Pottern resuspendiert. Abermalige Zentrifugation bei 8500 g und Abheben von 100 μ l Überstand folgten. Daran schloß sich ein dritter Waschvorgang an. Die Vereinigung der drei Überstände ergab schließlich wieder 300 μ l Endvolumen, was einer Verdünnung des Serums von 1:10 entsprach.

Wie entsprechende Vorversuche mit verschiedenen Mengen von eingesetztem ANT zeigten, befand man sich hier schon mit 50 μ g im Sättigungsbereich.

II.2.4. Bindungsstudien mit spezifischen Liganden

II.2.4.1. Bindungsstudien mit dem spezifischen Liganden CAT

Carboxylatractylat weist als Ligand des ANT eine sehr starke Affinität (Dissoziationskonstante $K_d < 1 \times 10^{-8}$) auf (60) und bindet spezifisch an das "aktive Zentrum" des ANT in seiner "c"-Konformation. Für die Versuche wurden jeweils frisch isolierte Mitochondrien von Herz, Leber und Niere verwendet (Isolierung siehe II.2.4.). Die Mitochondrien wurden mit Puffer (0.25 M Saccharose, 10 mM Mops, 1 mM EDTA, pH 7.4) auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt und auf Ansätze von 100 μ l entsprechend einer Proteinmenge von 0.5 mg verteilt. Anschließend wurde Serum in einer Menge von 100 μ l/mg mitochondriales Protein zugegeben und die Probe kräftig gemischt. Die Inkubationsdauer betrug 20 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ unter dauerndem Mischen des Ansatzes. Anschließend wurden bei Herz- und Nierenmitos 10 μ l einer 75 μM CAT-Lösung, die radioaktiv markiertes ^3H -CAT enthielt, entsprechend einer Aktivität von 7000 cpm/10 μ l, zu den Ansätzen pipettiert und der Ansatz kräftig gemischt. Bei Lebermitochondrien wurde wegen des niedrigeren Gehaltes an ANT und damit niedrigerer Bindung eine Beladung mit 10 μ l einer 10 μM CAT-Lösung mit einem Anteil von ^3H -CAT, entsprechend einer Aktivität von 7000 cpm, angeboten. Nach verschiedenen langen Inkubationszeiten bis zu 30 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ wurde 1 ml Puffer zugegeben und der Ansatz bei 8500 g abzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschgänge, um unspezifisch gebundenes CAT zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 0.5 ml Puffer resuspendiert, zur Auflösung der Mitochondrien mit 40 μ l Perchlorsäure versetzt und schließlich die gebundene Aktivität nach

Zugabe von 5 ml Szintillatorflüssigkeit im beta-Zähler bestimmt. Als Kontrollwert wurden auch Ansätze ohne Serum durchgeführt. Die gebundene Aktivität betrug mit NHS bzw. ohne Serum etwa 2000 cpm/0.5 mg Mitochondrien.

Um eine mögliche Verdrängung des CAT durch Antikörper zu untersuchen, wurde der Versuchsablauf umgestellt und zuerst die Beladung der Mitochondrien durchgeführt und diese beladenen Mitochondrien dann erst mit den Seren inkubiert. Der übrige Versuchsablauf verlief gleich.

II.2.4.2. Bindungsstudien mit dem spezifischen Liganden BKA

BKA bindet an dem der Matrixseite zugewandten Teil des ANT, und fixiert diesen in der "m"-Konformation. BKA muß daher im Gegensatz zu CAT in die Mitochondrien diffundieren, um von dort an den ANT binden zu können (6,56). Der Versuchsansatz verlief bis auf die Beladung mit BKA analog den Versuchen zur Messung der Bindung von CAT (siehe II.2.4.1.). Die Beladung erfolgte hier bei 20°C für die Dauer von 10 Min.. Zur Beladung wurden 15 µl einer 55 µM Lösung von BKA mit einem Anteil von ^3H -BKA entsprechend 9000 cpm/15 µl angeboten. Vor der Beladung wurden 10 µl einer 1 mM Lösung von ADP zu jedem Ansatz gegeben, um ein "Umklappen" des ANT in seine "m"-Konformation zu fördern. Die Waschvorgänge erfolgten bei 20°C mit einer Inkubationsdauer von je 5 Minuten, um das nicht gebundene BKA aus den Zellen auszuspülen. Es wurden so Beladungen von etwa 1500 cpm/0.5 mg Protein für Herz- und Nierenmitochondrien erreicht.

Für Lebermitochondrien konnte dieser Versuch leider nicht durchgeführt werden, da die niedrige spezifische Aktivität des BKA wegen des

geringeren Gehaltes der Lebermitochondrien an ANT eine signifikante Aussage nicht erlaubte.

II.2.5. Beeinflußung des Adenin-Nukleotid-Austausches

II.2.5.1. Messung des Adenin-Nukleotid-Austausches an Mitochondrien aus Herz, Leber und Niere

Als Parameter für die funktionelle Aktivität der Antikörper wurde der Transport von ADP über die innere mitochondriale Membran gemessen. Die Messung erfolgte mit Hilfe der "Inhibitor-stop-Methode" (77). Als Ausgangssubstanz dafür wurden frisch isolierte Mitochondrien von Meerschweinchenherzen bzw.-lebern oder Kälbernieren verwendet. Die Mitochondrien wurden im Prinzip wie in II.2.1.3. beschrieben isoliert. Zur Organentnahme wurden die erwachsenen, etwa 400 g schweren Tiere getötet und der Brustkorb eröffnet. Nach dem Durchschneiden des Gefäßstieles wurden die Organe entnommen und sofort in kalten Puffer I (0.25 M Saccharose, 2 mM EGTA, pH 7.4 mit KOH eingestellt) gelegt. Die weitere Verarbeitung der Organe erfolgte im Kühlraum bei 4°C. Die Organe wurden zuerst von den größeren Gefäßen bzw. bindegewebigen Anteilen befreit. Es folgte grobes Kleinschneiden mit einer Schere und mehrmaliges kräftiges Waschen mit Puffer I. Anschließend wurde das Material in Puffer II (0.25 M Saccharose, 5 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH 7.4) überführt und kräftig kleingeschnitten. Die weitere Zerkleinerung des Gewebes erfolgte mit einem Potter. Der Potterstempel hatte eine Drehzahl von 250 Upm. Das Pottergefäß war in Eiswasser getaucht und

und beim Pottern wurde kein Unterdruck auf die Mitochondrien ausgeübt, um ein Zerplatzen zu vermeiden. Es wurde ein Glaspotter mit Teflon-Stempel verwendet, der locker in den Kolben paßte. Eigene Erfahrungen und auch Literaturstellen (92) zeigten, daß die Ausbeute an Mitochondrien bei einem locker eingeschliffenem Potterstempel größer war als bei einem streng sitzendem. Dieser Effekt beruht wohl darauf, daß bei locker sitzendem Stempel nicht so hohe Scherkräfte auf die Mitochondrien wirkten und dadurch eine Zerstörung verhindert wurde. Zum vollständigen Aufschluß des Gewebes waren etwa 3-4 Pottergänge nötig. Nach erneuter Einstellung des pH auf 7.4 wurden die Proben auf etwa 150 ml verdünnt und bei 4°C mit 600 g 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 4-fache Gaze abgossen, um kleine Gewebefetzen und Fett im Überstand zurückzuhalten, und anschließend bei 11000 g 20 Min. zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit Puffer II. Das Pellet wurde schließlich in Puffer III (0.25 M Saccharose, 10 mM Mops, 0.5 mM EDTA, 2.0 mM $MgCl_2$, pH 7.4) aufgenommen und der Proteingehalt nach der Methode von Biuret gemessen. Die Ausbeute betrug bei einem Meerschweinchenherzen etwa 7-10 mg und bei einer Meerschweinchenleber etwa 200-250 mg mitochondriales Protein.

Zur Beladung wurden 20 mg Mitochondrien aus Herz, Leber oder Niere verwendet. Die Beladung erfolgte im Volumen von 1 ml mit 40 μ l ^{14}C -ADP mit einer spezifischen Aktivität von 42.6 mCi/mmol. Die zugegebene Radioaktivität betrug 0.8 μ Ci. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der Ansatz mit Puffer III auf 40 ml verdünnt und bei 11000 g 20 Minuten lang abzentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in Puffer IV (0.25 M Saccharose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) wurde es durch Pottern resuspendiert und auf eine Konzentration von 7.5 mg/ml verdünnt. Die Suspension mit dem ^{14}C -ADP beladenen

Mitochondrien wurde nun in Proben zu je 200 μ l aufgeteilt und mit Antiseren in einer Konzentration von 100 μ l/mg Protein bzw. 10 μ l/mg Protein inkubiert. Die Seren waren vorher 24 Stunden lang bei 4°C in Dialyseschläuchen gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer gleichgewichtsdialysiert worden. Die Kunststoffschläuche waren für Substanzen unter einem Molekulargewicht von 30000 durchgängig. Durch diese Gleichgewichtsdialyse sollten Ionen und andere störende Stoffe im Serum entfernt werden. Zunächst waren auch Versuche mit den aus den Seren isolierten IgG-Antikörpern durchgeführt worden, da jedoch kein Unterschied zu dem Serumdialysat zu beobachten war, wurde später auf eine Isolierung der IgG-Moleküle verzichtet. Zu einer Probe wurde kein Serum zugegeben und zu einer zweiten nur Normalhumanserum. Diese beiden Proben dienten als Kontrollen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden zu den Proben je 20 μ l einer 350 mM Lösung von Succinat/Glutamat und 10 μ l einer 350 mM Lösung von Na_2PO_4 hinzugegeben. Es folgte eine Verdünnung des Ansatzes mit Puffer IV auf ein Gesamtvolumen von 1600 μ l, wobei auf eine gute Durchmischung der Proben geachtet wurde. Anschließend wurden diese in Ansätze zu je 200 μ l aufgeteilt. Die Messung des ADP-Transportes über die innere mitochondriale Membran wurde durch Zugabe von 10 μ l einer 10 mM Lösung von kaltem ADP gestartet. Auf Grund des Konzentrationsunterschiedes von ADP vom extramitochondrialen zum intramitochondrialen Raum kommt es zu einem Austausch von beladenem, "heißen" ADP im Mitochondrium gegen unbeladenes, "kaltes" ADP im extramitochondrialen Milieu. Nach einer bestimmten Zeit wurde der Transport durch die Zugabe von 10 μ l einer 2.5 mM Lösung von CAT gestoppt. Die Zeiten, nach denen die Reaktion gestoppt wurde, waren 0 Sek., 5 Sek., 10 Sek., 20 Sek., 40 Sek. und 120 Sek.. Die Reaktionen wurden für jeweils 11 Proben

simultan gestartet bzw. gestoppt mittels Drahtgabeln, deren Zinken mit ADP bzw. CAT beladen waren und die in die Reaktionsgefäße getaucht wurden. Mehrmaliges Ein- und Austauschen der Gabeln garantierte eine gute Durchmischung der Suspension. Zu den Proben, die eine Reaktionszeit von 0 Sek. haben sollten, wurde nur CAT zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend bei 8500 g 5 Minuten lang abzentrifugiert. Vom Überstand, der das "ausgetauschte" ^{14}C -ADP enthielt, wurden 150 μl mit 5 ml Szintillator-Flüssigkeit versetzt und im beta-Zähler gezählt. Außerdem wurde zur Bestimmung der gesamten in den Mitochondrien enthaltenen Radioaktivität, dem sog. Total-Wert (T-Wert), zu einem Ansatz der Probe 20 μl konzentrierte Perchlorsäure, die eine Auflösung der Mitochondrien bewirkte, pipettiert, der Ansatz gut gemischt und anschließend 150 μl gezählt. Die Austauschrate zur untersuchten Zeit x errechnet sich dann nach der Formel:

$$A_x = \frac{\text{cpm}_x - \text{cpm}_0}{\text{cpm}_T - \text{cpm}_0} \times 100 (\%)$$

wobei cpm_x die Aktivität im Überstand nach der Reaktionszeit x, cpm_T die totale in dem Ansatz enthaltene Radioaktivität (=T-Wert) und cpm_0 die Radioaktivität im Überstand ohne Zugabe von kaltem ADP (Reaktionszeit = 0 Sek.) ist. In den Nullwert gehen die versuchsunabhängige, natürlich Hintergrundstrahlung, nur unspezifisch an die Mitochondrien gebundenes ^{14}C -ADP, sowie durch Undichtwerden der Membranen aus den Mitochondrien ausgeströmtes ^{14}C -ADP ein.

Dieser Nullwert nimmt mit der Zeit zwischen Beladung und Messung der Radioaktivität im Überstand zu. Er betrug normalerweise weniger als 10% des T-Wertes. Die Geschwindigkeit, mit der der Austausch abläuft, hängt vor allem von der Temperatur, bei der die Reaktion vor sich geht, ab. Erfahrungsgemäß wurde bei dieser Versuchsanordnung und den verwendeten Konzentrationen eine Temperatur von 0°C bei Herz- und Nierenmitochondrien gewählt. Bei Lebermitochondrien wurde dagegen 10°C gewählt, da hier der Austausch wegen des geringeren Gehalts der inneren mitochondrialen Membran an ANT sonst zu langsam abläuft. Die Höhe der Austauschrate, die maximal erreicht wird, hängt von dem Verhältnis der Konzentration von extramitochondrial angebotenem, "kalten" ADP zu in den Mitochondrien enthaltenem "heißen" ADP während des Austausches ab.

Eine Hemmung des Austausches errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Hemmung} = \frac{A_{xK} - A_{xp}}{A_{xK}} \times 100 (\%)$$

Dabei ist A_{xK} die Austauschrate der Kontrolle bei der gewählten Zeit x , und A_{xp} ist die Austauschrate der zu messenden Probe bei der gleichen Zeit x . Bei der Angabe der Hemmung des Austausches für ein Serum wurde der Mittelwert aus der Hemmung zu den einzelnen gemessenen Zeiten angegeben.

II.2.5.2. Messung des Adenin-Nukleotid-Austausches an submitochondrialen Partikeln

Bei submitochondrialen Partikeln handelt es sich um Partikel, die durch die Behandlung von Mitochondrien mit Schallwellen entstehen. Es kommt dabei zu Zerreißen der Mitochondrienmembranen, worauf sich die Membranen umstülpen und, wegen ihrer starken Hydrophobizität sofort wieder kugelige Gestalt annehmen. Es entstehen also sog. "inside-out" Partikel, wobei dann der ANT in der "m"-Konformation nach aussen gerichtet ist (53). Zur Herstellung der submitochondrialen Partikel wurden Herz- bzw. Lebermitochondrien verwendet. Diese waren nach den unter II.2.1. vorgestellten Methoden isoliert und bis zur Verarbeitung bei -40°C gelagert worden. Nach dem Auftauen wurden die Mitochondrien in Puffer I (0.25 M Saccharose, 10 mM Mops, 15 mM Mg Cl_2 , 2 mM ADP) aufgenommen und auf einen Proteingehalt von 10 mg/ml verdünnt. Zur Beschallung wurde die Mitochondriensuspension in einem dünnwandigen und gut wärmeleitenden Gefäß in eine Kältemischung aus Eiswasser mit Kochsalz (-7°C) gestellt, um eine Erwärmung der Suspension auf über $+10^{\circ}\text{C}$ bei der Beschallung zu verhindern. Außerdem mußten die Beschallungsstärke und -dauer bzw. die Pausen dazwischen so gewählt werden, daß eine stärkere Erwärmung der Mitochondriensuspension verhindert wurde. In einer Reihe von Vorversuchen hat sich dabei eine Beschallung von 10 x 10 Sekunden bei jeweils 50 Sekunden Pause mit der Mikro-Spitze bei einem Abgabewert von 6 auf der Skala des Beschallungsgerätes bei stoßweiser Beschallung mit 60% Wirkanteil als ideal erwiesen. Es wurde dabei eine Ausbeute an SMP's von 15-20% der Ausgangsmenge an Mitochondrien erreicht. Nach der Beschallung wurde die Suspension bei 15000 g 20 Min. bei $+4^{\circ}\text{C}$

zentrifugiert, um eine Sedimentation von intakten Mitochondrien zu erreichen. Der Überstand wurde ein zweites Mal bei 100000 g für 40 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer II (0.25 M Saccharose, 10 mM Mops, pH 7.4) aufgenommen und der Proteingehalt nach der Methode von Biuret bestimmt. Anschließend wurden 20 mg SMP's mit 100 μ l 14 C-ADP entsprechend einer Aktivität von 2 uCi inkubiert. Die spezifische Aktivität des 14 C-ADP war 42.6 nCi/mmol. Die Inkubation erfolgte bei 1 ml Gesamtvolumen bei +4°C für 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben auf 40 ml verdünnt und bei 100000 g 40 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer III (0.25 M Saccharose, 30 mM KCL, 1 mM EDTA, 10 mM Mops, 5 mM Succinat, 1 μ M Rotenon, pH 7.4) aufgenommen. Der Austausch wurde bis auf kleine Unterschiede wie bei den Mitochondrien durchgeführt (siehe II.2.4.1.). Die Reaktion wurde mit dem für die "m"-Konformation spezifischen Liganden BKA mit einer Menge von 10 μ l einer 1 mM Lösung gestoppt. Die Abzentrifugation der Ansätze erfolgte bei 100000 g für 30 Min.. Der gemessene Nullwert war bei dem Austausch mit SMP's mit bis zu 30% des T-Wertes deutlich höher als bei Mitochondrien. Dies erklärt sich durch die schädigende Wirkung der Beschallung auf die Mitochondrienmembran, was zu einem Leakage durch die Membran führt, und die längere Versuchsdauer.

II.2.6. Aufbereitung der Seren

Die Seren waren mit einer großlumigen Kanüle aus einer peripheren Vene abgenommen worden, nach einer nur kurzen Stauung des Gefäßes.

Anschließend wurden sie in Serumröhrchen ohne gerinnungshemmende Substanz eingefüllt. Nach 2 Stunden Aufbewahrung bei Raumtemperatur wurden die Seren über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden sie 10 Minuten bei 6000 g zentrifugiert, das Serum in kleine Portionen verteilt und bis zum Verbrauch bei -40°C gelagert. Hämolytische Seren wurden verworfen.

II.2.7. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Mittelwerte wurden, soweit angegeben, gemäß der Definition als die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl dieser Beobachtungen, errechnet. Als charakteristischer Wert für die Streuung oder Dispersion der Einzelwerte um den Mittelwert wurde die Standardabweichung berechnet. Sie ist praktisch gleich der Wurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichungen (83).

Die Signifikanzwahrscheinlichkeit p , mit der sich 2 Kollektive unterscheiden, wurde mit dem t-Test nach Student (104) berechnet. Wie allgemein üblich wurde ein $P > 0.05$ als nicht signifikant bezeichnet. Für $P < 0.05$ ergibt sich somit eine Signifikanz auf dem 5% Niveau, für $P < 0.01$ auf dem 1%, und für $P < 0.001$ auf dem 0.1% Niveau (68).

II.3. Patienten

Es wurden bei dieser Arbeit die Seren von 17 Patienten mit MC und 25 Patienten mit DCM untersucht. Die Diagnosestellung war auf folgende Untersuchungen gestützt: Anamneseerhebung, Untersuchung der Seren auf Antikörper gegen cardiotrope Viren, Elektrokardiogramm (EKG), Echokardiographie, Herzkatheteruntersuchung einschließlich Koronarangiographie und Ventrikulographie, sowie rechtsventrikuläre Myokardbiopsie.

Die Diagnose "Myokarditis" (12,75) wurde dann gestellt, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: 1. In der Anamnese mußte ein unmittelbarer zeitlicher Zusammenhang zwischen einer viralen Infektion und den klinischen Symptomen einer Myokarditis gegeben sein. 2. In der Endomyokardbiopsie lagen die typischen histologischen Zeichen einer Myokarditis vor, und/oder 3. es hatte parallel zur Erkrankung eine Veränderung des Virusneutralisationstiters um mindestens zwei Titerstufen stattgefunden, wobei besonders Antikörper der IgM-Klasse Beachtung fanden, und/oder 4. es hatte eine Erhöhung der CK-MB oder der LDH im Rahmen eines Virusinfektes stattgefunden, bei gleichzeitig bestehenden Erregungsrückbildungsstörungen im EKG, wobei ein Herzinfarkt oder sonstige Herzmuskelschädigungen ausgeschlossen waren.

Eine DCM wurde entsprechend der Definition der WHO/ISFC task force (80) anhand folgender Kriterien diagnostiziert: 1. Es lag eine chronische Erkrankung des Herzmuskels unbekannter Ätiologie und ohne Assoziation mit anderen Erkrankungen vor. 2. Fälle einer spezifischen Herzmuskelerkrankung wurden ausgeschlossen. 3. Der histologische Befund der Endomyokardbiopsie war zumindest vereinbar mit der Diagnose "DCM".

Die Ergebnisse der Untersuchungen bei den einzelnen Patienten sind in den Tabellen II.1a+b. und II.2a+b. angegeben. Die Patienten sind dabei in 2 Kollektive nach der Diagnose DCM bzw. MC eingeteilt. Die beiden Kollektive sind entsprechend der Größe der Auswurffrac-tion (AF) in jeweils 3 Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe enthält Patienten mit einer schweren Einschränkung der AF auf Werte unter 40%, die 2. Gruppe Patienten mit einer mittleren AF von 40-60% und die 3. Gruppe Patienten mit einer normalen AF von mehr als 60%. Bei den Patienten der Gruppe 3 bestand der Verdacht auf eine beginnende Herzmuskelerkrankung ungeklärter Ursache, da sie trotz normaler AF und normaler Ventrikelgröße eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit in pharmakologischen Belastungstests zeigten. Eine MC wurde vermutet, wenn anamnestische Hinweise, uncharakteristische retrosternale Schmerzen, EKG-Veränderungen, Veränderungen der CK-MB und/oder die typischen histologischen Zeichen vorlagen.

In der Tab. II.1a+b. sind neben Geschlecht und Alter der Patienten in Jahren, die Werte für die AF in Prozent, das linksventrikuläre, enddiastolische Volumen (EDV) in Milliliter, der Herzindex (HI) in Liter pro Quadratmeter Körperoberfläche und die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit in Millimeter Quecksilbersäule pro Sekunde angegeben. Außerdem sind in Tab. II.1. die Mittelwerte der Befunde der einzelnen Gruppen und der Gesamtdurchschnitt in den beiden Kollektiven aufgelistet.

In der Tab. II.2a+b. sind unter anderem die histologischen Befunde der Myokardbiopsieproben aufgeführt. Es wurden hierbei die wichtigsten histologischen Merkmale, die zur Diagnose MC bzw. DCM beitrugen, aufgelistet: Zellinfiltrate = ZI, Zellyse = ZL und interstitielle Fibrose = IF. Weiterhin wurden die Antikörpertiter gegen Viren, sowie

die Titerverläufe, soweit vorhanden, aufgelistet. Bei den EKG-Befunden wurden folgende Veränderungen angegeben: Linksschenkelblock (LSB), Rechtsschenkelblock (RSB), atrioventrikulärer Block (AVB), Erregungsrückbildungsstörungen (ERS), und Herzrhythmusstörungen (RS), Extrasystolen (ES).

Als Kontrollkollektiv (KK) wurden die Seren von 30 herzgesunden Blutspendern mitgetestet.

Außerdem wurden die Seren von 7 Patienten mit einer Kardiomyopathie alkoholtoxischer Genese (ACM, täglicher Alkoholkonsum mehr als 100 Gramm) mituntersucht (siehe Tab. II.l.c.).

Ein weiteres getestetes Kollektiv bildeten noch die Seren von 14 Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit. Bei 8 dieser Patienten, die alle koronarangiographiert waren, war es bereits zu einem enzymatisch, elektrokardiographisch und angiographisch nachgewiesenem Infarktgeschehen gekommen. Die Zeitdauer zwischen Infarktgeschehen und Blutabnahme lag zwischen 2 Wochen und 3 Monaten. Der hämodynamische Schweregrad entsprach dem Stadium II-IV nach der Einteilung der New York Heart Association.

	<u>Initialen</u>	<u>Geschlecht</u> (m/w)	<u>Alter</u> (Jahre)	<u>AF</u> (%)	<u>EDV</u> (ml)	<u>HI</u> (ml/minxqm)	<u>dp/dtmax</u> (mmHg/sec)
<u>DCM,</u>							
<u>AF < 40%</u>	G.A.	w	54	10	371	1,7	----
	R.H.	m	69	22	226	1,8	1247
	H.J.	m	23	16	500	2,5	----
	E.L.	w	57	32	177	1,8	657
	K.S.	m	47	39	198	2,9	750
	E.T.	m	20	10	377	1,5	----
	Durchschnitt:		45	21,5	308,2	2,03	884,6
<u>DCM,</u>							
<u>AF=40-60%</u>	H.G.	m	58	41	188	2,5	400
	P.K.	m	40	56	273	3,0	1611
	A.L.	m	42	46	159	2,2	----
	J.L.	m	50	55	172	2,6	----
	H.M.	w	60	47	185	3,2	1374
	H.P.	m	47	42	109	1,5	682
	J.P.	m	57	59	142	2,3	1220
	Durchschnitt:		50,6	49,4	175,4	2,47	1057,4
<u>DCM,</u>							
<u>AF > 60%</u>	B.B.	w	41	73	96	3,3	1890
	M.C.	w	29	62	90	2,5	----
	M.F.	m	43	71	158	3,2	833
	J.G.	m	43	70	208	2,3	1300
	N.G.	m	34	80	96	2,0	----
	A.K.	m	34	75	120	3,0	----
	R.R.	m	60	76	137	4,03	1444
	K.R.	m	31	64	154	2,3	810
	G.R.	m	32	66	184	2,8	2100
	G.S.	w	44	72	144	3,1	1500
	G.S.	m	48	66	153	1,9	1673
	G.S.	m	33	75	119	2,5	1000
	Durchschnitt:		39,3	70,8	138,3	2,79	1394,4
	Gesamtdurchschnitt:		43,8	55,2	197,3	2,52	1204,8

Tab.: II.1a. Alter, Geschlecht und Herzkatheterdaten der untersuchten Patienten mit DCM.

	<u>Initialen</u>	<u>Geschlecht</u> (m/w)	<u>Alter</u> (Jahre)	<u>AF</u> (%)	<u>EDV</u> (ml)	<u>HI</u> (ml/minxqm)	<u>dp/dtmax</u> (mmHg/sec)
<u>MC_I</u>							
AF < 40%	W.B.	m	37	26	216	2,1	1100
	K.F.	m	59	35	171	2,2	1350
	K.G.	m	42	39	241	2,6	-----
	R.H.	w	47	21	374	1,8	767
	E.T.	m	20	15	324	1,7	-----
	Durchschnitt:		41	27,2	265,2	2,08	1060,6
<u>MC_{II}</u>							
AF=40-60%	A.B.	m	60	42	---	2,0	-----
	J.B.	m	42	60	98	2,5	1622
	J.F.	w	52	58	219	2,8	-----
	E.H.	w	45	43	160	2,8	-----
	M.H.	w	65	--	---	---	-----
	Durchschnitt:		52,5	55,6	159	2,53	-----
<u>MC_{III}</u>							
AF > 60%	S.B.	m	25	70	99	2,9	-----
	A.G.	w	45	67	95	2,6	1055
	H.S.	w	23	82	52	2,4	1144
	F.S.	w	49	68	184	2,9	1555
	M.S.	w	44	76	120	3,4	1900
	B.S.	w	52	61	94	1,8	-----
	A.S.	m	52	76	127	2,1	-----
	Durchschnitt:		41,4	71,4	110,1	2,58	1344
	Gesamtdurchschnitt:		44,5	53,6	170,0	2,41	1272,2

Tab.: II.1b. Alter, Geschlecht und Herzkatheterdaten der untersuchten Patienten mit MC

<u>Initialen</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter</u>	<u>AF</u>	<u>EDV</u>	<u>HI</u>
	(m/w)	(Jahre)	(%)	(ml)	(ml/minxqm)
H.E.	m	33	34	190	1,6
D.G.	m	42	67	173	2,5
L.G.	m	40	28	201	2,8
E.H.	m	50	57	318	2,7
S.K.	m	44	36	235	2,4
R.P.	m	42	69	146	4,1
R.W.	m	44	59	199	2,4
Durchschnitt:		42,1	50,0	208,9	2,64

Tab.: II.1c. Alter, Geschlecht und Herzkatheterdaten der untersuchten Patienten mit ACM.

	<u>Initialen</u>	<u>Biopsie</u>	<u>Virustiter</u>	<u>EKG</u>	<u>Anamnese</u>
<u>DCM,</u> AF < 40%	G.A.	DCM	----	ES, ERS	DCM
	R.H.	DCM, IF	B2/4 1:128 B3 1:64, 1:16	LSB	DCM, V.a.Z.n.MC
	H.J.	DCM, IF, ZI	----	LSB	DCM
	E.L.	DCM, IF, ZI	----	LSB	DCM
	K.S.	DCM, ZI	----	ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	E.T.	DCM, IF	Cox. B IgM pos.	LSB, ES	DCM, V.a.Z.n.MC
<u>DCM,</u> AF=40-60%	H.G.	DCM, IF, ZI	----	AVB, ES	DCM
	P.K.	DCM, IF	----	RS	DCM, V.a.Z.n.MC
	A.L.	DCM, IF	----	RSB, RS	DCM, V.a.Z.n.MC
	J.L.	DCM	----	RSB, ES	DCM
	H.M.	DCM, IF	----	LSB	DCM, V.a.Z.n.MC
	H.P.	DCM, IF, ZI	----	ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	J.P.	DCM	----	----	DCM
<u>DCM,</u> AF > 60%	B.B.	DCM, IF	----	RS	DCM, V.a.Z.n.MC
	M.C.	DCM, IF	----	----	DCM, V.a.Z.n.MC
	M.F.	DCM	Cox. B IgM pos	ES, RS	DCM
	J.G.	DCM	B1 1:128, B2 1:4, RS, ERS B3 1:16, B4 1:16 B5 1:4		DCM, V.a.Z.n.MC
	N.G.	DCM, IF	----	ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	A.K.	DCM, IF, ZI	B1 1:128 B2 1:32 B3 1:1024	RS	DCM, V.a.Z.n.MC
	R.R.	DCM	----	ES, ERS	DCM
	K.R.	DCM	----	ES, ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	G.R.	DCM, IF	----	ES, RS	DCM
	G.S.	DCM	----	ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	G.S.	DCM	----	ES, ERS	DCM, V.a.Z.n.MC
	G.S.	DCM, IF	----	ES	DCM, V.a.Z.n.MC

Tab.: II.2a. Ergebnisse der Auswertung der Myokardbiopsie, Antikörpertiter gegen Coxsackie-Viren, EKG und Anamnese der Patienten mit DCM.

V.a.Z.n.MC = Verdacht auf Zustand nach Myokarditis

	<u>Initialen</u>	<u>Biopsie</u>	<u>Virustiter</u>	<u>EKG</u>	<u>Anamnese</u>
<u>MC,</u> <u>AF < 40%</u>	W.B.	----	B3 1:256, 1:64	RS	MC
	K.F.	MC, ZI, ZL	----	RS, ERS	MC
	K.G.	MC, ZI, ZL	B4 IgM pos.	LSB	MC
	R.H.	MC, ZI, IF	----	LSB, ERS	MC
	E.T.	MC, ZI, ZL	Cox. B pos.	LSB, ES	MC
<u>MC,</u> <u>AF=40-60%</u>	A.B.	MC, ZI, ZL, IF	----	RS	MC
	J.B.	MC, ZI, ZL, IF	B4 1:2048	ERS, RS	MC
			B3 1:68, 1:124		
	I.F.	MC, ZI	----	ES	MC, CK+LDH erh.
	E.H.	MC, ZI, ZL, IF	B3 1:64	ERS, LSB	MC
	M.H.	----	B3 1:64, 1:256	ERS, RS	MC
<u>MC,</u> <u>AF > 60%</u>	S.B.	MC, ZI	----	ERS	MC, CK+LDH erh.
	A.G.	Normalbefund	B4 1:2024, 1:512	ES, ERS	MC
	H.S.	MC, ZI, ZL, IF	B2 1:2048	ERS	Peri-MC
			B3 1:512		
			B4 1:2048, B5 1:8		
	F.S.	MC, ZI, ZL, IF	----	RS	MC
	M.S.	MC, ZI, ZL, IF	B2 1:64, 1:512		MC
			B4 1:256		
			B5 1:128		
	B.S.	fokale MC, ZI, ZL, IF	----	ERS, RS	MC
	A.S.	MC, ZI, ZL, IF	----	ERS, RS	MC

Tab.: II.2b. Ergebnisse der Auswertung der Myokardbiopsien, Antikörpertiter gegen Coxsackie-Viren, EKG und Anamnese der Patienten mit MC.

III. Ergebnisse

III.1. Der Adeninnukleotidtranslokator als organspezifisches

Autoantigen

III.1.1. Bindung der Antikörper am ANT

Die Bindung der Antikörper am ANT wurde im Radioimmunoassay gemessen.

Die Werte für die Bindung der Antikörper am ANT von Herz, Leber und Niere sind in Tab. III.1. dargestellt. Es wurde dabei die gleiche Gruppeneinteilung nach der AF wie in Tab. II.1a. verwendet.

Bei der Verwendung des ANT aus Herzmuskel als Antigen zeigten sowohl die Pat. mit DCM als auch die mit MC eine signifikante Bindung ($p < 0,001$) im Vergleich zum Kontrollkollektiv, hingegen ergab sich für die Patienten mit KHK und ACM keine Bindung ($p = 0,46$ bzw. $0,92$). Die Patienten mit DCM und MC unterschieden sich nicht in ihrer Antikörperaktivität gegenüber dem ANT ($p = 0,19$) (siehe Abb. III.1).

Teilt man die Patienten mit DCM bzw. MC entsprechend dem hämodynamischen Schweregrad der Erkrankung nach der Größe der AF in die drei Gruppen $AF < 40\%$, $AF = 40-60\%$ und $AF > 60\%$ ein, so zeigt sich, daß sowohl im MC- als auch im DCM-Kollektiv die Patienten mit einer $AF < 40\%$ den höchsten AK-Titer aufwiesen, die sich in den jeweiligen Kollektiven signifikant von denen der Patienten mit einer $AF > 40\%$ bzw. $> 60\%$ unterschieden. Die Patienten mit einer $AF = 40-60\%$ unterscheiden sich dagegen nicht bei der DCM ($p = 0,46$) bzw. nicht signifikant ($p = 0,092$) bei der MC von den Patienten mit einer $AF > 60\%$ (siehe Abb. III.2. und Abb. III.3.).

Testete man im SPRIA die Serumaktivität gegenüber dem ANT von Leber,

<u>Gruppe</u>	<u>Initialen</u>	<u>Herz</u>	<u>Leber</u>	<u>Niere</u>
<u>DCM,</u>				
<u>AF < 40%</u>	G.A.	15000	4850	5700
	R.H.	8450	2800	4250
	H.J.	9150	4100	7050
	E.L.	12950	7500	6850
	K.S.	12400	2750	8100
	E.T.	13350	6600	7000
<u>DCM,</u>				
<u>AF=40-60%</u>	H.G.	4650	3000	3050
	P.K.	4350	1550	1700
	A.L.	4100	2100	2200
	J.L.	4450	1750	2300
	H.M.	3850	2500	3050
	H.P.	7900	4000	4850
	J.P.	6350	3350	3300
<u>DCM,</u>				
<u>AF > 60%</u>	B.B.	7850	5800	5900
	M.C.	5600	2750	2800
	M.F.	5750	5400	4950
	J.G.	4450	3050	3000
	N.G.	4150	4400	2500
	A.K.	5500	3700	3750
	R.R.	6150	3050	3400
	K.R.	2050	1550	1000
	G.R.	7950	3850	4600
	G.S.	10500	8300	8950
	G.S.	4000	2500	3000
	G.S.	4750	3000	3850
<u>MC,</u>				
<u>AF < 40%</u>	W.B.	18000	9850	11450
	K.F.	7850	5050	4000
	K.G.	24450	16800	14350
	R.H.	9500	5450	5900
	E.T.	12750	6900	6200
<u>MC,</u>				
<u>AF=40-60%</u>	A.B.	4050	2800	2700
	J.B.	5500	3400	2550
	J.F.	6250	5300	2300
	E.H.	4650	2300	2400
	M.H.	7150	5250	6350
<u>MC,</u>				
<u>AF > 60%</u>	S.B.	6950	2400	5200
	A.G.	6150	5450	3400
	H.S.	7800	5600	5100
	F.S.	7750	2400	5250
	M.S.	12800	2750	1400
	B.S.	6450	3350	3000
	A.S.	5050	2900	2650

Tab.: III.1. Bindung der Antikörper am ANT von Herz, Leber und Niere im Radioimmunoassay. Die Ergebnisse sind in der gemessenen Zahl der Zerfälle pro Minute (cpm) angegeben.

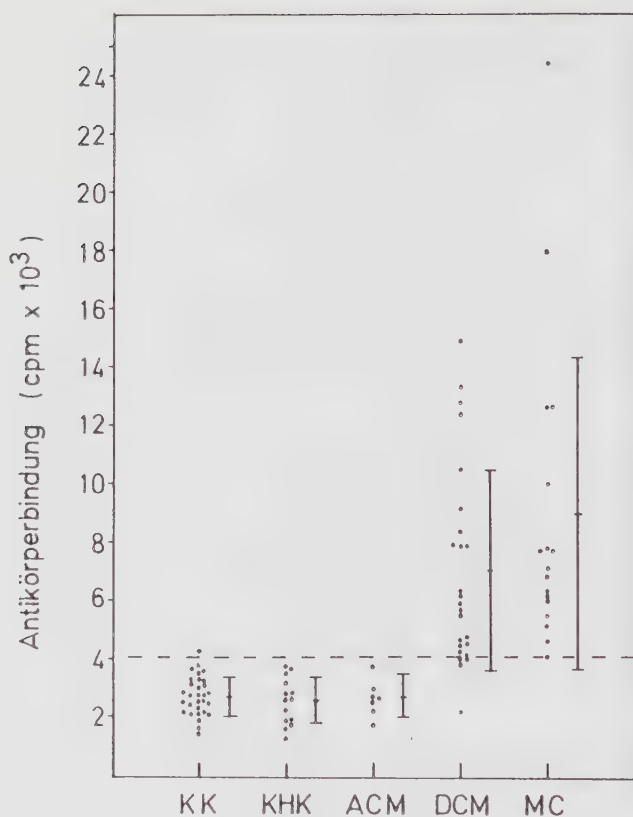


Abb. III.1.: Höhe der Antikörperbindung am ANT des Herzens im SPRIA. Der 2s-Bereich des Kontrollkollektivs (Nullwert) ist mit einer gestrichelten Linie angegeben. Die Kollektive mit KHK und ACM unterscheiden sich nicht vom Kontrollkollektiv. Die beiden Kollektive mit DCM und MC dagegen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$) sowohl vom Kontrollkollektiv als auch von den Kollektiven mit KHK und ACM.

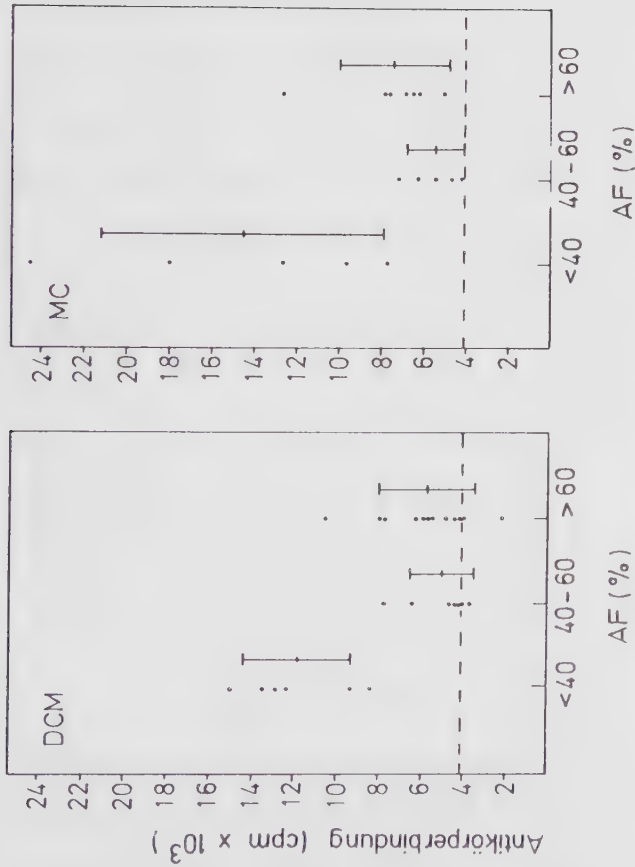


Abb. III.2. und III.3.: Antikörperbindung der DCM- bzw. MC-Seren am ANT des Herzens. Die beiden Kollektive sind entsprechend der Höhe der Auswurfaktion in jeweils drei Gruppen mit einer AF<40%, AF=40-60% und AF>60% unterteilt. Der 2s-Bereich des Nullwertes ist mit gestrichelter Linie angegeben.

so zeigte sich in 32% bei der DCM und in 53% bei der MC zwar eine Bindung am Leber-ANT. Im Vergleich zur Bindung am Herzprotein war diese jedoch bei allen Patienten deutlich niedriger ($p < 0,001$). Wurde die Antikörperaktivität gegenüber dem ANT der Niere getestet, so zeigte sich zwar in 44% bei der DCM und in 47% bei der MC eine Bindung am ANT, jedoch war diese in allen Fällen deutlich niedriger als die Bindung am Herzprotein ($p < 0,0001$). Die Höhe der Bindung am ANT der Leber unterschied sich nicht von der Höhe der Bindung am ANT der Niere. Ebenso unterschieden sich die Ergebnisse der Patienten mit DCM nicht von denen der Patienten mit MC (siehe Abb. III.4. und III.5.). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Teil der Autoantikörper gegen organspezifische Determinanten am ANT des Herzens gerichtet waren.

III.1.2. Absorptionsstudien

Um die Frage zu beantworten, ob die unterschiedliche Bindung der Antikörper am ANT der drei Organe Herz, Leber und Niere durch eine unterschiedliche Affinität oder aber durch eine echte Organspezifität der Antikörper bedingt ist, führten wir Absorptionsstudien sowohl an dem isolierten Protein als auch an Mitochondrien durch.

Hierbei wurden sämtliche Versuche im Sättigungsbereich durchgeführt, d.h. eine weitere Erhöhung des Antigens führte zu keiner weiteren Absorption von Antikörpern. Die bei den einzelnen Patienten gefundenen

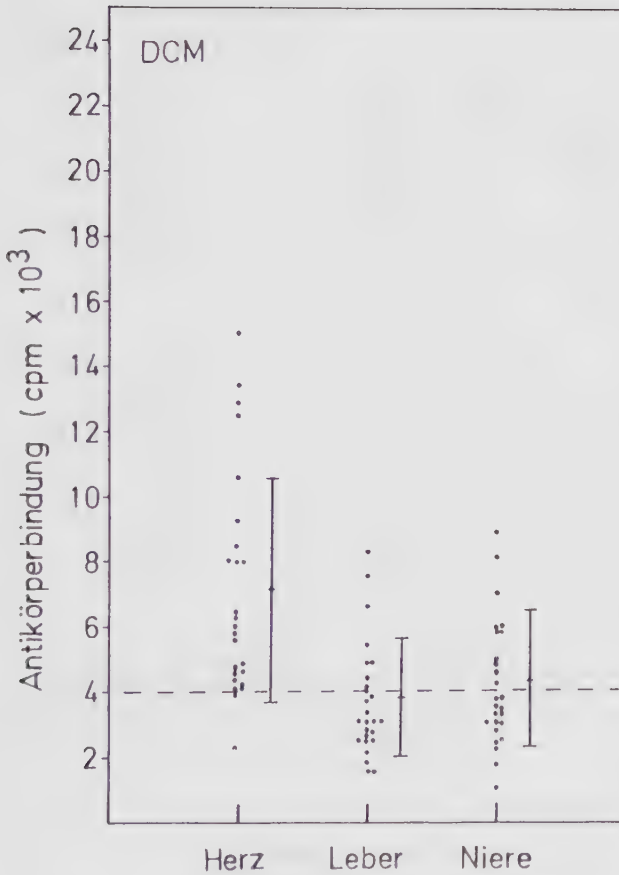


Abb. III.4.: Antikörperbindung am ANT von Herz, Leber und Niere bei der DCM. Die Bindung am ANT von Leber und Niere unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) von der Bindung am ANT vom Herz. Der 2s-Bereich des Nullwertes ist mit gestrichelter Linie angegeben.

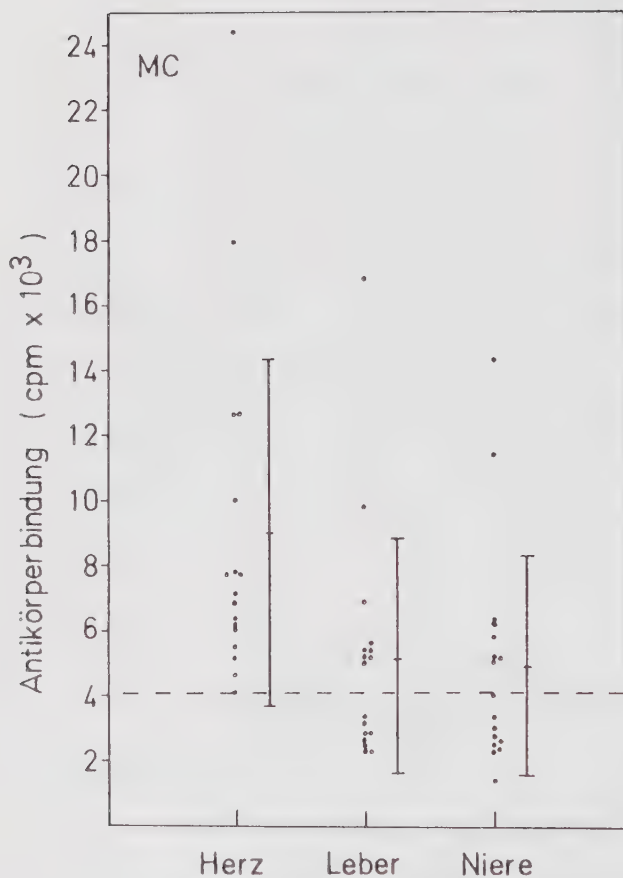


Abb. III.5.: Antikörperbindung am ANT von Herz, Leber und Niere bei der MC. Die Bindung am ANT von Leber und Niere unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) von der Bindung am ANT vom Herz. Der 2s-Bereich des Nullwertes ist mit gestrichelter Linie angegeben.

<u>Initialen</u>	<u>Antigen: ---</u>	<u>Herzmit.</u>	<u>Lebermit.</u>	<u>ANT(Herz)</u>	<u>ANT(Leber)</u>
<u>DCM</u>					
G.A.	15000	6750	13150	2400	12100
R.H.	8450	4650	6350	3650	6800
H.J.	9150	6450	8500	4400	8650
E.L.	12950	8550	10200	3200	7550
K.S.	12400	7850	11200	1900	8900
E.T.	13350	7750	11400	4100	10800
H.P.	7900	3800	6300	----	----
N.G.	4150	2600	3700	----	----
A.K.	5500	3750	4800	----	----
<u>MC</u>					
W.B.	18000	11100	15250	3800	13900
K.F.	7850	4800	7900	2100	5100
K.G.	24450	11200	18350	4350	14450
R.H.	9500	4750	9200	1900	7600
E.T.	12750	3800	9800	2600	5500
J.B.	5500	4100	5550	2400	3700
J.F.	6250	4350	5900	1900	3100
M.H.	7150	5250	6800	----	----
H.S.	7800	4200	8100	----	----
A.S.	5050	3300	4900	----	----

Tab.: III.2. Antikörperbindung am ANT vom Herz vor und nach Absorption.
 Als Antigen wurden bei der Absorption je 500 mg Herz- und Lebermitochondrien
 und je 50 mg isolierter ANT von Herz und Leber pro 30 ul Serum verwendet.
 Die Ergebnisse sind in cpm angegeben.

Werte sind in Tab. III.2. angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl bei der Absorption an Herzmitochondrien (siehe Abb. III.6.) als auch am isolierten ANT vom Herz (siehe Abb. III.7.) eine signifikante Verminderung des Titors erreicht wurde ($p < 0,001$). Es trat jedoch auch eine Verminderung der Antikörper bei der Absorption an Lebermitochondrien (siehe Abb. III.6.) und am isolierten ANT der Leber (siehe Abb. III.7.) auf ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$).

Bei der Verwendung von isoliertem ANT aus Herzmuskel als Absorbens betrug die noch verbleibende Restaktivität im Durchschnitt 2,9% der Ausgangsaktivität oder 250 cpm und lag damit praktisch im gleichen Bereich wie die Normalseren. Absorbierte man mit dem isoliertem ANT der Leber, so betrug die verbleibende Restaktivität hingegen 60,6% oder 5600 cpm.

Bei der Absorption mit Herzmitochondrien als Antigen verblieb eine durchschnittliche Restaktivität von 40,6% der Ausgangsaktivität oder 3050 cpm.

Bei der Absorption mit Lebermitochondrien dagegen betrug die verbleibende Restaktivität 81,7% oder 6100 cpm (siehe Abb.: III.8.).

Hieraus ergibt sich, daß ein Teil der Antikörper, die vom isolierten Herzprotein absorbiert wurden, vom Leberprotein nicht absorbiert werden konnte. Ebenso konnte ein Teil der Antikörper, die von Herzmitochondrien absorbiert wurden, nicht von Lebermitochondrien absorbiert werden. Nur der isolierte ANT vom Herz kann praktisch alle Antikörper im Serum absorbieren, die Absorption ist bei ihm signifikant am höchsten ($p < 0,001$). Dies belegt die Organspezifität der Antikörper.

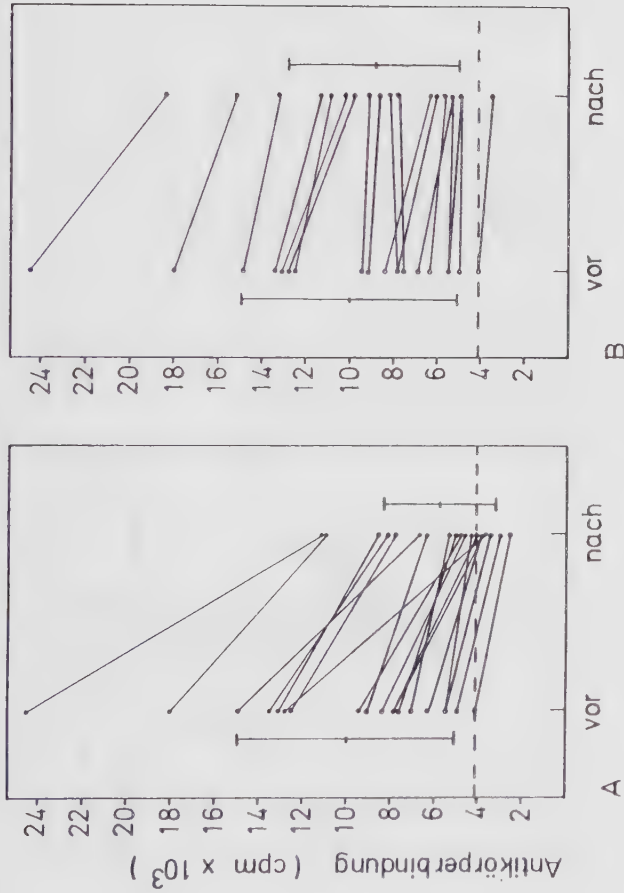


Abb. III.6.: Antikörperbindung am ANT vom Herz vor und nach Absorption an Mitochondrien. In Darstellung A wurde an Herzmitochondrien, in Darstellung B wurde an Lebermitochondrien absorbiert (0,5 mg/30 ul Serum). Die Ergebnisse vor und nach Absorption unterscheiden sich jeweils signifikant ($p < 0,001$). Die gestrichelte Linie gibt den 2s-Bereich des Nullwertes an.

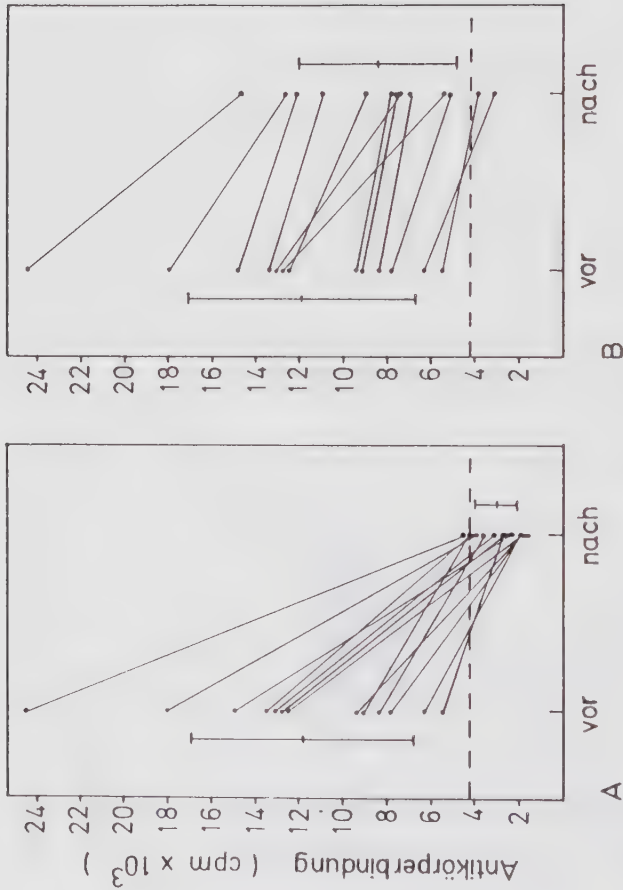


Abb. III.7.: Antikörperbindung am ANT vom Herz vor und nach Absorption am isolierten ANT. In Darstellung A wurde am ANT vom Herzen, in Darstellung B wurde am ANT der Leber absorbiert (0,05 mg/30 μ l Serum). Die Ergebnisse vor und nach Absorption unterscheiden sich jeweils signifikant ($p < 0,001$). Die gestrichelte Linie gibt den 2s-Bereich des Nullwertes an.

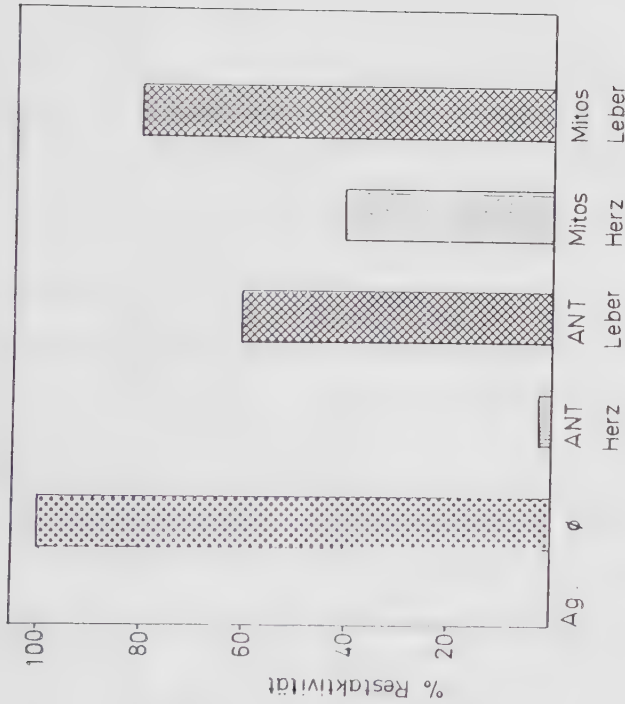


Abb. III.8.: Durchschnittlich verbliebene Restaktivität in % der Ausgangsaktivität nach der Absorption am ANT von Herz und Leber, sowie Herz- und Lebermitochondrien. Als Antigen bei der Absorption wurden 500 ug Mitochondrien bzw. 50ug ANT verwendet.

III.2. Hemmung der Bindung der spezifischen Liganden CAT und BKA

Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper wurden Bindungsstudien mit den spezifischen Liganden CAT und BKA durchgeführt.

Es konnte im Serum von 4 Patienten mit DCM (= 16%) und ebenfalls bei 4 Patienten mit MC (= 23,5%) eine Erniedrigung der Bindung des spezifischen Liganden CAT an Mitochondrien nach vorheriger Inkubation mit dem Antiserum beobachtet werden (siehe Tab. III.3.). Die mittlere Hemmung betrug dabei 24,5% bei DCM und 37,8% bei MC (siehe Abb. III.9.). Die Erniedrigung der Bindung war sowohl bei den MC-Seren ($p < 0,001$), als auch bei den DCM-Seren ($p < 0,02$) signifikant.

Die Frage, ob bei den übrigen Patienten, bei denen keine Erniedrigung der CAT-Bindung zu beobachten war, eine Verdrängung der Antikörper durch CAT stattgefunden hatte, wurde mit verschiedenen langen Inkubationszeiten von CAT untersucht. Es zeigte sich keine Zeitabhängigkeit der Höhe der CAT-Bindung im Bereich von 10 Sekunden bis 30 Minuten. Eine kürzere Inkubationszeit war bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich.

Darüber hinaus untersuchten wir, ob die Antikörper CAT aus seiner Bindungsstelle verdrängen können. Bei dem entsprechenden Versuchsansatz mit ^3H -CAT vorbeladenen Mitochondrien, die anschließend mit den Antiseren inkubiert wurden, zeigte sich keine signifikante Verminderung der Bindung von ^3H -CAT nach Inkubation der Mitochondrien mit den Antisera.

Eine Hemmung der Bindung des spezifischen Liganden BKA konnte bei den Patienten mit DCM in 18 von 25 Fällen (= 72%) beobachtet werden. Bei der MC waren es 13 von 17 (= 76%). Die Erniedrigung der Bindung betrug

	Initialen	Mitos (Herz)	Mitos (Le./Ni.)	SMPs (He./Le)	CAT (Herzm.)	CAT (Leberm.)	BKA (Herzm.)
<u>DCM_r</u>							
AF < 40%	G.A.	35,3	0	0	23,2	0	13,6
	R.H.	39,6	0	0	0	0	27,3
	H.J.	52,6	0	0	0	0	29,3
	E.L.	29,6	0	0	0	0	18,5
	K.S.	26,7	0	0	0	0	36,9
	E.T.	32,5	0	0	42,6	0	33,4
<u>DCM_r</u>							
AF=40-60%	H.G.	92,8	0	0	12,8	0	43,2
	P.K.	0	0	0	0	0	0
	A.L.	37,1	0	0	0	0	19,7
	J.L.	0	0	0	0	0	0
	H.M.	22,7	0	0	0	0	17,8
	H.P.	31,0	0	0	0	0	23,2
	J.P.	38,3	0	0	0	0	52,1
<u>DCM_r</u>							
AF > 60%	B.B.	27,3	0	0	19,5	0	23,6
	M.C.	54,1	0	0	0	0	31,2
	M.F.	31,0	0	0	0	0	15,1
	J.G.	21,2	0	0	0	0	32,0
	N.G.	0	0	0	0	0	0
	A.K.	41,4	0	0	0	0	43,4
	R.R.	28,0	0	0	0	0	14,7
	K.R.	0	0	0	0	0	0
	G.R.	0	0	0	0	0	0
	G.S.	27,3	0	0	0	0	18,3
	G.S.	0	0	0	0	0	0
	G.S.	0	0	0	0	0	0
<u>MC_r</u>							
AF < 40%	W.B.	44,0	0	0	41,3	0	24,9
	K.F.	26,0	0	0	0	0	12,1
	K.G.	34,1	0	0	43,6	0	33,0
	R.H.	32,9	0	0	0	0	17,8
	E.T.	51,3	0	0	32,1	0	28,2
<u>MC_r</u>							
AF=40-60%	A.B.	0	0	0	0	0	0
	J.B.	34,9	0	0	0	0	22,7
	I.F.	27,0	0	0	0	0	21,5
	E.H.	25,3	0	0	0	0	39,8
	M.H.	36,3	0	0	0	0	31,2
<u>MC_r</u>							
AF > 60%	S.B.	26,3	0	0	0	0	19,2
	A.G.	0	0	0	0	0	0
	H.S.	32,4	0	0	0	0	32,1
	F.S.	37,1	0	0	0	0	44,1
	M.S.	56,8	0	0	34,1	0	38,2
	B.S.	0	0	0	0	0	0
	A.S.	0	0	0	0	0	0

Tab.: III.3. Hemmung des Nukleotidtransportes an Herz-, Leber- und Nierenmitochondrien und submitochondrialen Partikeln von Herz- und Lebermitochondrien, sowie Hemmung der CAT-Bindung an Herz- und Lebermitochondrien, sowie der BKA-Bindung an Herzmitochondrien. Die Ergebnisse sind in % Hemmung angegeben.

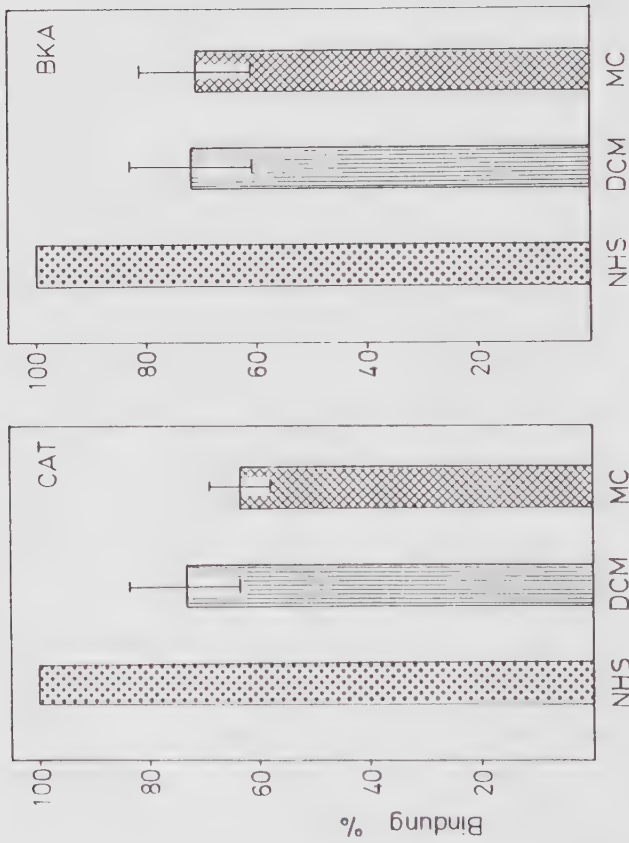


Abb. III.9.: Höhe der Bindung von CAT und BKA nach der Zugabe von NHS, DCM- oder MC-Seren in % der maximalen Bindung. Sowohl die CAT- als auch die BKA-Bindung sind signifikant erniedrigt ($p < 0,05$).

im Mittel 27,4% bei der DCM und 29,4% bei der MC (siehe Abb. III.17.), die beiden Kollektive unterschieden sich somit nicht in der Höhe der Hemmung ($p = 0,61$). Das Ausmaß der Hemmung war jeweils signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$).

Es wurde bei allen Patienten, bei denen eine Hemmung der CAT-Bindung festgestellt wurde, auch eine Hemmung des Nukleotidtransportes *in vitro* gefunden, ebenso war auch eine Erniedrigung der BKA-Bindung immer mit einer Hemmung des Nukleotidtransportes korreliert. Im Gegensatz dazu war bei einem Großteil der Patienten, die eine Hemmung des Nukleotidtransportes und der BKA-Bindung zeigten, keine gleichzeitige Erniedrigung der CAT-Bindung zu beobachten.

III.3. Organ- und konformationsspezifische Hemmung der Funktion des ANT

Als ein Parameter für die funktionelle Aktivität der Antikörper wurde ihr Einfluß auf den Adenin-Nukleotid-Transport über die mitochondriale Membran mit Hilfe der "inhibitor-stop"-Methode gemessen. Die Versuche wurden sowohl mit der isolierten IgG-Fraktion der Seren als auch mit gleichgewichtsdialysierten Seren durchgeführt. Es ergab sich prinzipiell keine Beeinflussung des Nukleotidtransportes durch die Zugabe von Normalhumanserum bzw. den IgG aus Normalseren. Die Ergebnisse für die einzelnen Patienten sind in Tab. III.3. aufgeführt.

Als typisches Beispiel sind die Ergebnisse bei dem Serum des Patienten H.G. in Abb. III.10. dargestellt. Es ist hier eine deutliche Hemmung des Austausches von ADP an Herzmitochondrien zu sehen. Diese Hemmung war konzentrationsabhängig und war bei genügend hoher Serumverdünnung (1 : 256) nicht mehr nachweisbar. Wie dieses Serum zeigten auch die restlichen getesteten Seren keine Hemmung des Nukleotidtransportes von Leber- bzw. Nierenmitochondrien. Die Antikörper, die die Hemmung des Nukleotidtransportes bewirken, sind also organspezifisch.

Unter den hier verwendeten Bedingungen betrug die mittlere Hemmung des Nukleotidaustausches bei den Patienten mit DCM 37,1% (siehe Abb. III.11.), bei den Patienten mit MC 35,7% (siehe Abb. III.12.), d.h. die durchschnittliche Hemmaktivität gegenüber dem ANT unterscheidet sich in beiden Kollektiven nicht.

Bei der Unterteilung der Kollektive nach dem hämodynamischen Schweregrad der Erkrankung zeigte sich, daß sowohl bei der DCM als auch bei der MC alle Patienten mit einer AF von weniger als 40% Antikörper enthielten, die eine Hemmung des Nukleotidtransportes bewirkten (siehe Abb. III.13. und Abb. III.14.). Bei den Pat. mit einer AF von 40-60% zeigte sich bei der DCM eine Hemmung in 71 % und bei der MC in 80 %. Bei einer AF > 60% lagen die Werte bei 58,3% für die DCM und bei 57,1% für die MC.

Bei der Messung des Nukleotidtransportes an submitochondrialen Partikeln ergaben sich die in Abb. III.15. repräsentativ für alle Seren dargestellten Werte. Es wurde dabei wieder das Serum des Pat. H.G. verwendet, welches an Mitochondrien den Nukleotidtransport stark gehemmt hatte. An SMPs bewirkte dieses Serum keine Hemmung des Nukleotidtransportes. Auch sämtliche übrigen Seren der Patienten mit DCM oder MC, welche an Mitos eine Hemmung des Nukleotidtransportes

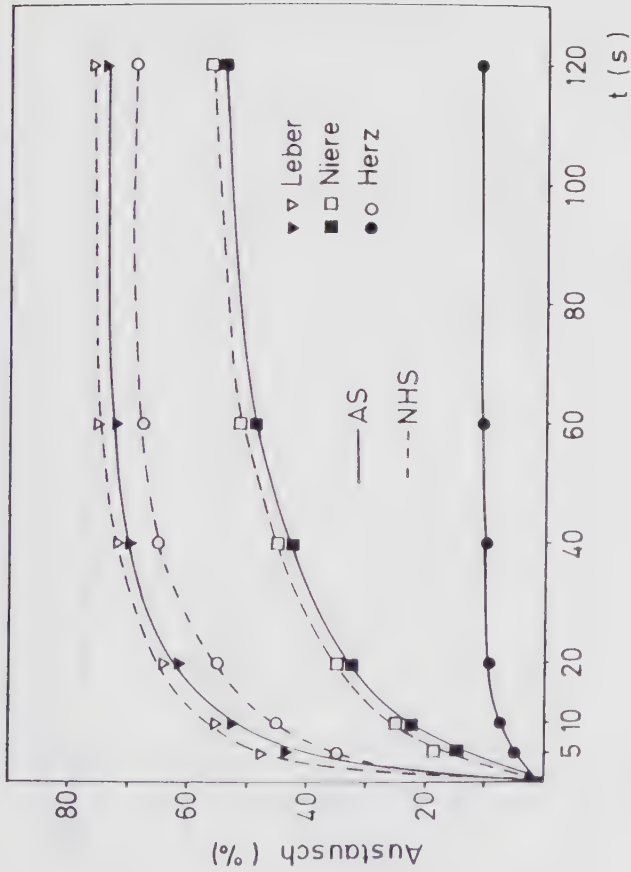


Abb. III.10.: Höhe des Nukleotidaustausches in % bei Herz-, Leber- und Nierenmitochondrien. Es wurde Serum des Patienten H.G. und NHS verwendet. Die Serumkonzentration im Versuchsansatz war 200 μ l Serum pro 1mg Protein.

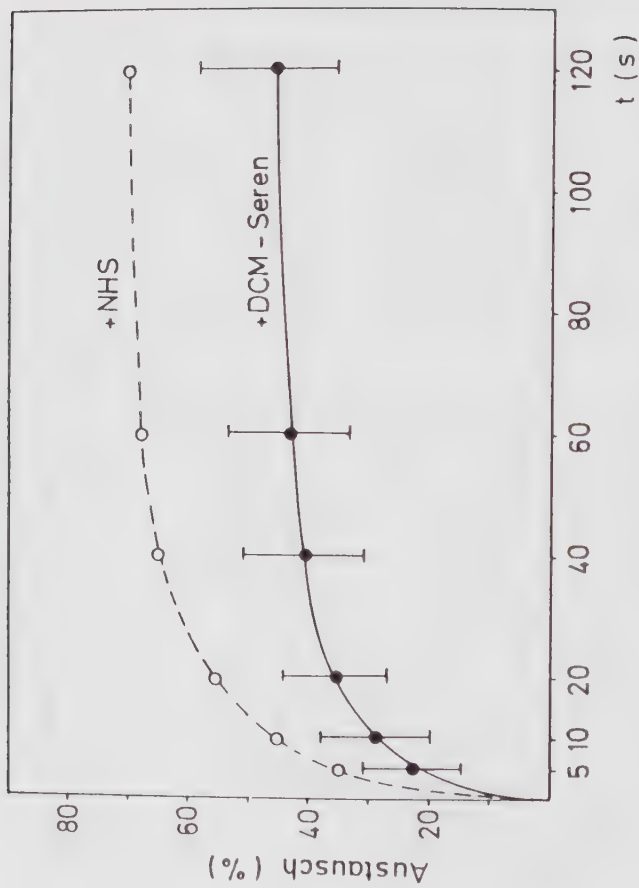


Abb. III.11.: Durchschnittliche Höhe des Nukleotid-Austausches bei den "hemmenden" DCM-Seren zu den verschiedenen Zeiten.

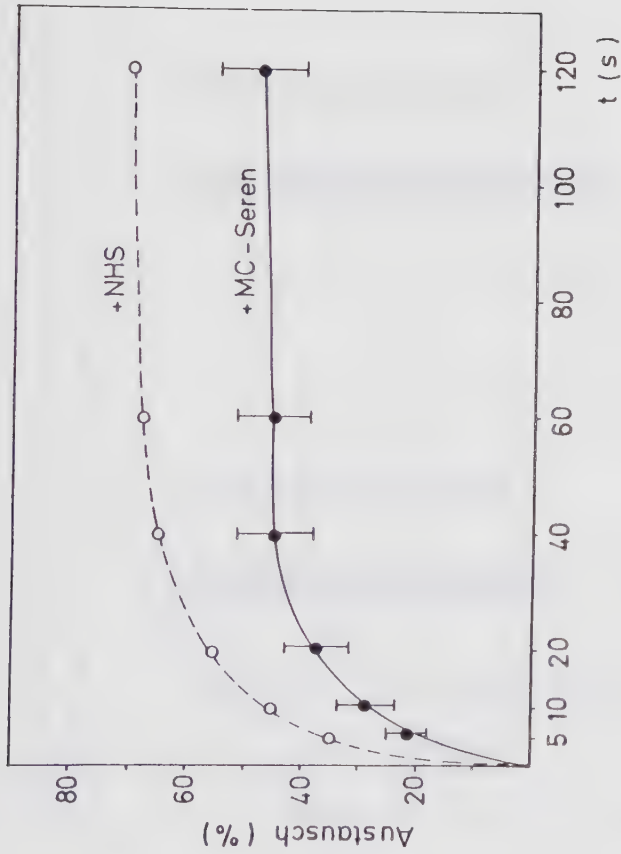


Abb. III.12.: Durchschnittliche Höhe des Nukleotid-Austausches bei den "hemmenden" MC-Seren zu den verschiedenen Zeiten.

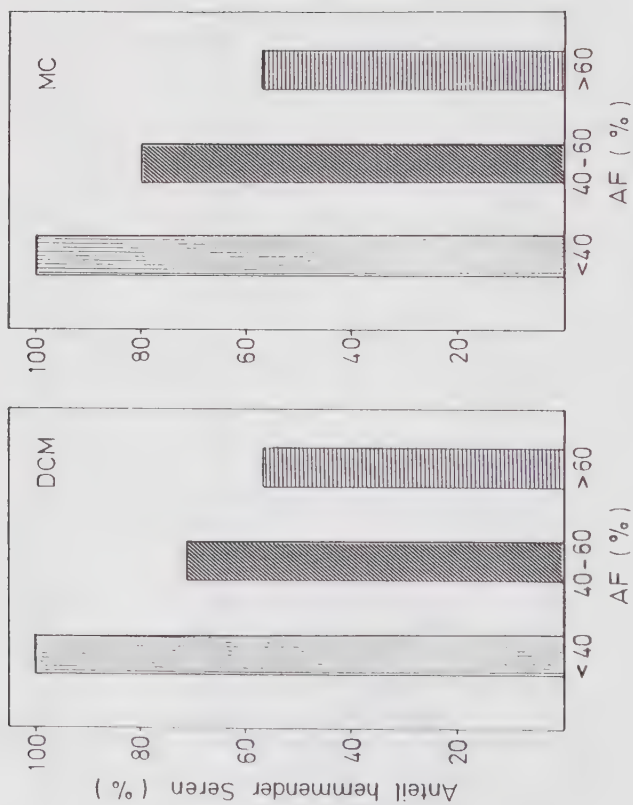


Abb. III.13. und III.14.: Anteil von Seren, die den Nukleotidtransport hemmen, bei DCM und MC. Die beiden Kollektive sind dabei jeweils nach der Höhe der AF unterteilt.

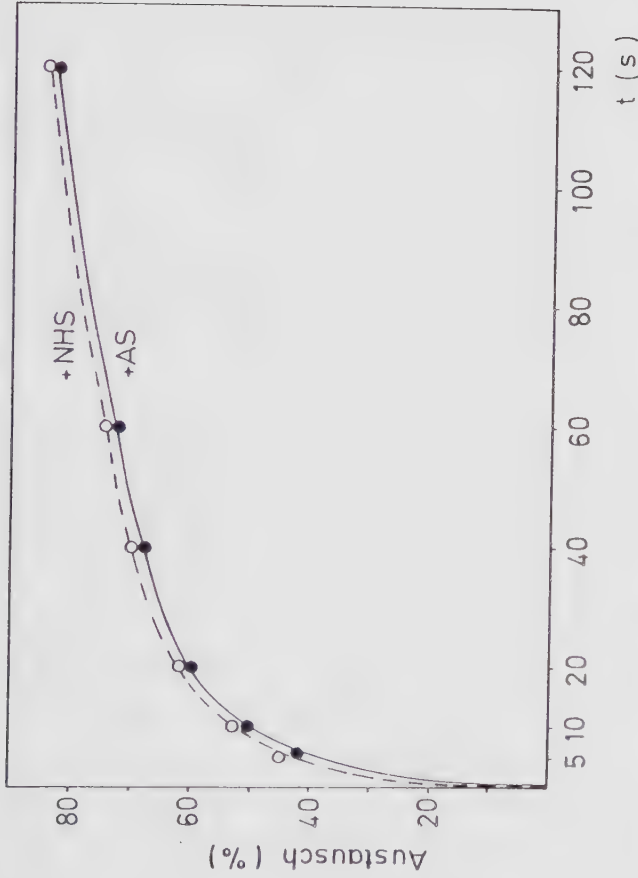


Abb. III.15.: Messung des Nukleotidaustausches an submitochondrialen Partikeln (SMFs). Es wurde Serum des Patienten H.G. in einer Konzentration von 200 μ l pro 1 mg Protein verwendet.

bewirkten, zeigten keine Hemmung des ANT bei SMPs. Ebenso veränderte ein Kontrollserum den Nukleotidaustausch an SMPs nicht. Die Antikörper, die eine Hemmung des Nukleotidtransportes an Mitochondrien bewirkten, sind also konformationsspezifisch gegen die "c"-Konformation gerichtet. Eine Hemmung des ANT in seiner "m"-Konformation wurde in keinem Fall beobachtet.

Bei der Titration zeigten die Seren, die zu einer Hemmung des ANT an Mitochondrien geführt hatten, zwei verschiedene Formen von Titrationskurven.

Die einen Seren zeigten erwartungsgemäß eine Abnahme der Hemmung des ANT bei abnehmender Serumkonzentration im Versuchsansatz. Ein typisches Beispiel zeigt Abb. III.16.. Es handelt sich dabei um das Serum des Pat. H.G..

Andere Seren dagegen bewirkten in hoher Konzentration keine signifikante Hemmung des ANT, mit zunehmender Verdünnung dagegen zeigte sich eine Hemmung. Durch eine weitere Verdünnung des Serums konnte dann der hemmende Effekt wieder aufgehoben werden. Ein typisches Beispiel für dieses Verhalten ist an Hand des Serums des Patienten M.C. in Abb. III.17. dargestellt. Das jeweilige Ausmaß der Hemmung in % im Vergleich zum Kontrollserum in den unterschiedlichen Serumverdünnungen ist in Abb. III.18. dargestellt. Bis zu einer Serumverdünnung von 1:16 kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Hemmung, eine weitere Verdünnung der Seren ergab wieder eine Abnahme der Hemmung. Ein solches Verhalten zeigten mehrere Seren. Sie sind in Tab. III.4. aufgeführt.

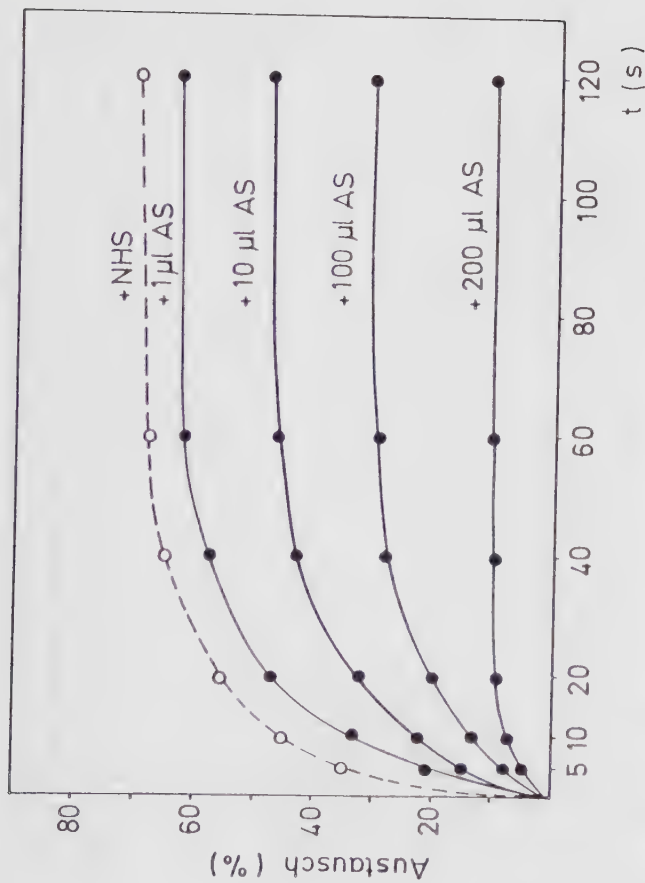


Abb. III.16.: Höhe des Nukleotidaustausches an Herzmitochondrien bei der Zugabe verschiedener Mengen von Serum des Patienten H.G. zu den verschiedenen Zeiten. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 mg Mitochondrien.

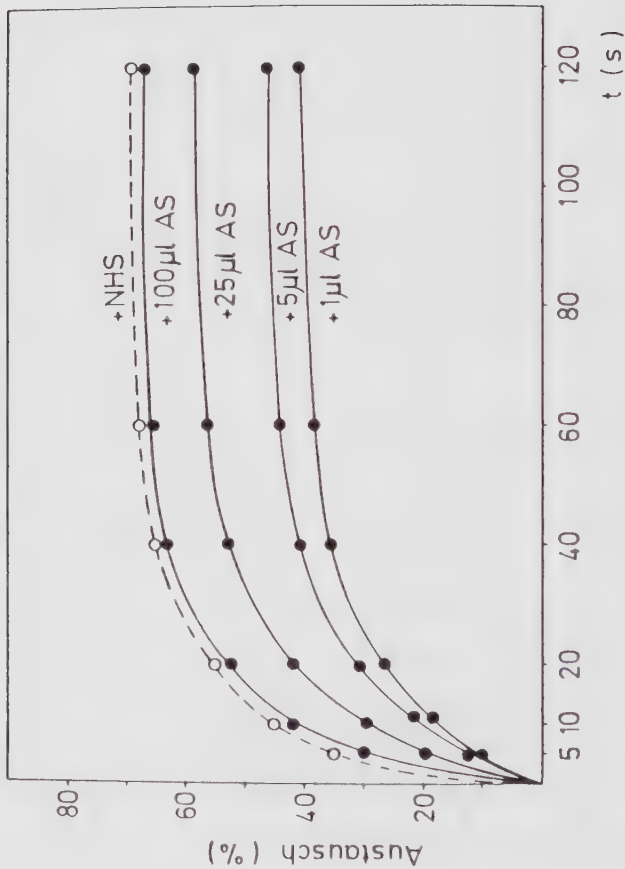


Abb. III.17.: Höhe des Nukleotidaustausches an Herzmitochondrien bei der Zugabe verschiedener Mengen von Serum des Patienten M.C. zu den verschiedenen Zeiten. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 mg Mitochondrien.

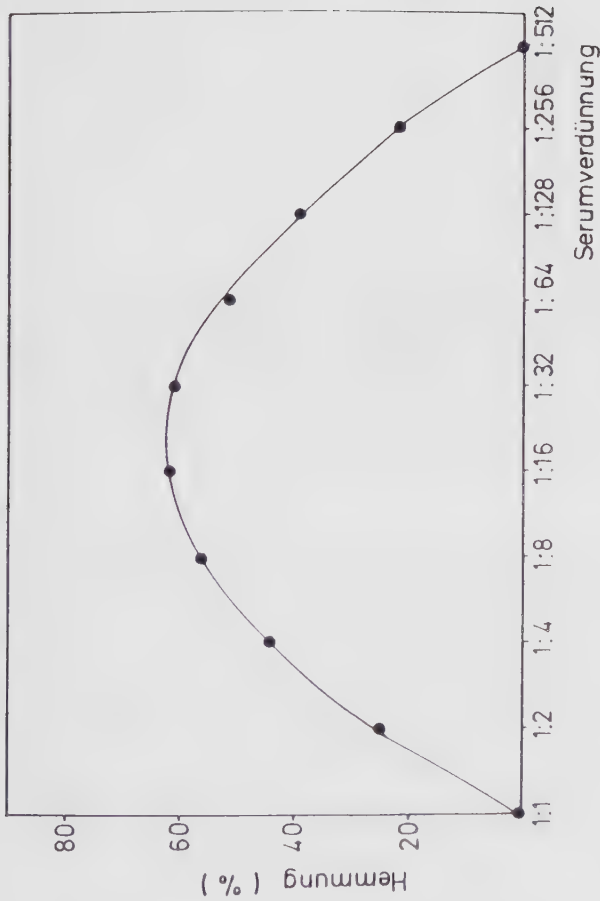


Abb. III.18.: Höhe der Hemmung des Nukleotidtransportes an Herzmitochondrien in Abhängigkeit von der Serumverdünnung (Patient M.C.). Die Ausgangskonzentration war 100 μ l pro 1 mg Mitochondrien.

<u>Initialen</u>	<u>Hemmung:</u>	<u>BKA-Bind.</u>	<u>Austausch:Herzmit.:</u>	<u>100ul/mg</u>	<u>50ul/mg</u>	<u>10ul/mg</u>
G.A.	13,6 %	0	11,3 %	35,3 %		
R.H.	27,3 %	0	0	39,6 %		
H.J.	29,3 %	0	19,3 %	52,6 %		
H.M.	17,8 %	0	0	22,7 %		
H.P.	23,2 %	0	18,2 %	31,0 %		
M.C.	31,2 %	0	29,2 %	54,1 %		
J.G.	32,0 %	0	0	21,2 %		
R.R.	14,7 %	0	0	28,0 %		
G.S.	18,3 %	0	0	27,3 %		
R.H.	17,8 %	0	16,7 %	32,9 %		
M.H.	31,2 %	0	19,9 %	36,3 %		
S.B.	19,2 %	0	12,1	26,3 %		
H.S.	32,1 %	0	21,8 %	32,4 %		

Tab.: III.4. Hemmung der BKA-Bindung und des Nukleotidtransportes an Herzmitochondrien. Die hier aufgeführten Seren hatten in einer Konzentration von 100 ul Serum pro 1 mg Mitochondrien nur die Bindung von BKA gehemmt. Bei der Zugabe von weniger Serum (50 ul bzw. 10 ul Serum / 1 mg Mitochondrien) war jedoch eine Hemmung des Nukleotidtransportes zu beobachten.

III.4. Antikörper, die ein Leakage am ANT verursachen

Die Seren von zwei Pat. mit MC (M.S. und E.T.) bewirkten an mit ^{14}C -ADP beladenen Mitochondrien eine Erhöhung des Ausstroms von ^{14}C -ADP, ohne daß der Nukleotidtransport mit "kaltem" ADP gestartet worden war. Durch Zugabe dieser Antiseren kam es konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung des Nullwertes um bis zu 35% im Vergleich zum Kontrollserum. Nach Vorinkubation der Mitochondrien mit CAT bzw. BKA war eine Erhöhung des Nullwertes durch das Antiserum nicht zu beobachten (siehe Abb. III.19.). Es müssen also in diesen Seren Antikörper vorliegen, die ein Nukleotidleakage am Translokator bewirken. Der lytische Effekt dieser Seren ist abhängig vom Verhältnis der Serummenge zur Menge des mitochondrialen Proteins. Diese Abhängigkeit wurde anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt, wobei die Ausgangskonzentration bei 100ul Serum pro mg mitochondriales Protein lag (siehe Abb. III.20.).

Dieser "lytische" Effekt trat auch parallel zu einer Hemmung des Nukleotidtransportes in ein und dem selben Serum auf. Die "lytische" Wirkung des Serums nahm dabei mit steigender Verdünnung ab. Die Hemmung des Nukleotidtransportes dagegen nahm zunächst mit steigender Serumverdünnung zu und erst bei höherer Serumverdünnung wieder ab. Die jeweiligen Verdünnungskurven für das Leakage und die Hemmung des ANT durch dieses Serum sind in Abb. III.21. dargestellt.

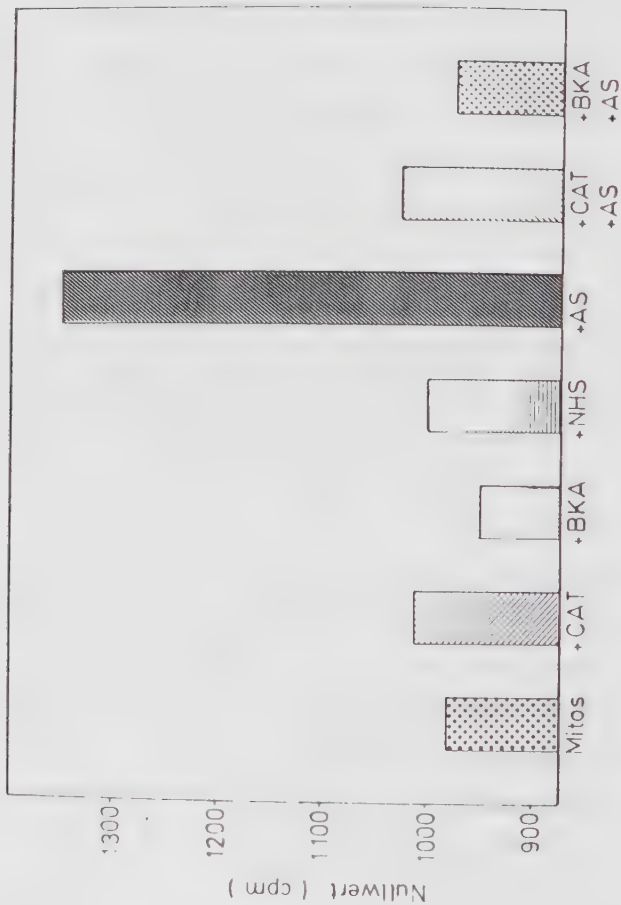


Abb. III.19.: Höhe des Nullwertes bei der Zugabe verschiedener Seren zu "beladenen" Mitochondrien. Es wurde dabei ein Serum getestet, das ein Nukleotidleakage verursachte. Durch Vorinkubation der Mitochondrien mit CAT oder BKA konnte es verhindert werden.

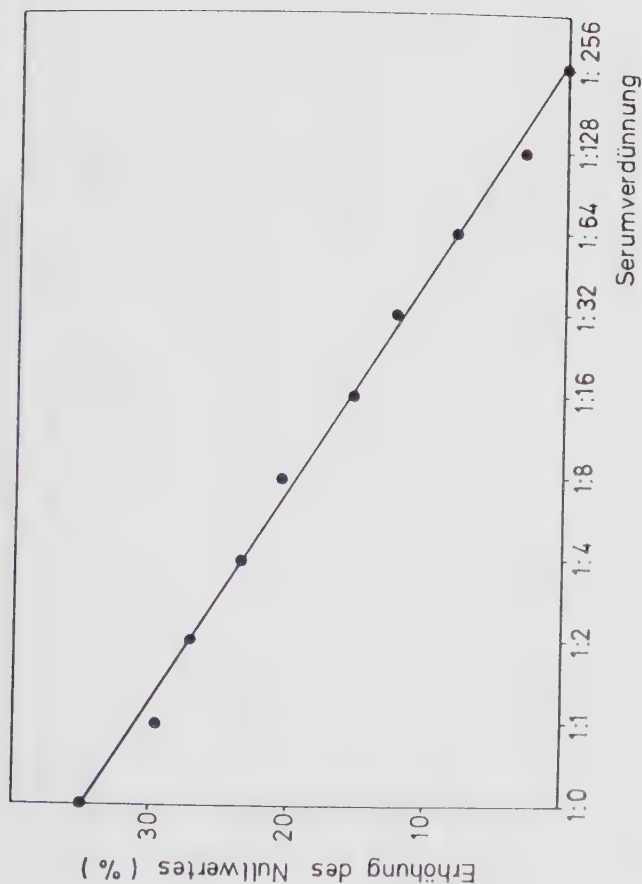


Abb. III.20.: Prozentuale Erhöhung des Nullwertes in Abhängigkeit von der Serumverdünnung (Patient M.S.). Die Ausgangskonzentration war 100 μ l/mg Protein.

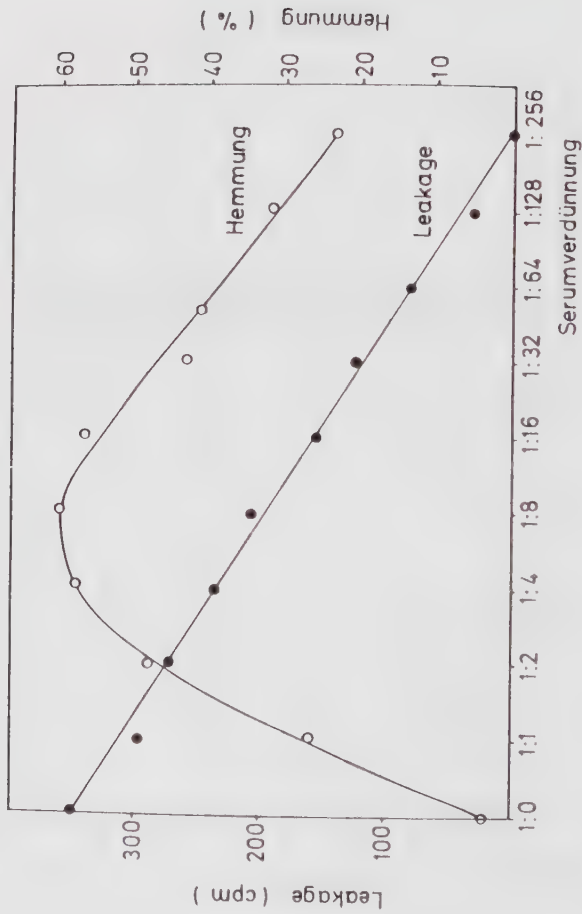


Abb. III.21.: Höhe des Nukleotidleakages und Hemmung des Nukleotidaustausches in einem Serum (Patient M.S.). Die Serumausgangskonzentration war 100 μ l pro 1 mg Mitochondrien.

IV. Diskussion

IV.1. Auftreten von organ- und konformationsspezifischen Antikörpern gegen den ANT

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß bei der MC und der DCM organ- und konformationsspezifische Autoantikörper gegen den ANT vorkommen (95,97,98,99). Daß diese Autoantikörper gegen den ANT gerichtet sind, erscheint aufgrund der Tatsache, daß der ANT das häufigste Membranprotein der Mitochondrien mit einem Anteil von bis zu 12 % darstellt, verständlich. Darüberhinaus konnte durch Oberflächenmarkierungen mit Jod-Peroxidase gezeigt werden, daß der ANT jenes Protein der mitochondrialen Membran darstellt, welches am meisten an der äusseren Seite der Membran aus dieser herausragt, wodurch es möglicherweise eher als Antigen zu erkennen ist (15,16).

Wesentlich für die Beurteilung der Ergebnisse ist es, daß die Proteinstruktur, die Funktionsfähigkeit und damit die Antigenität des Proteins durch den Isolationsvorgang nicht beeinträchtigt wurden. Durch die Isolation des ANT als CAT- bzw. BKA-Protein-Komplex ist es sichergestellt, daß das Protein während der verschiedenen Reinigungsschritte nicht denaturiert und entsprechend der Ligandenbindung in einer definierten Konformation vorliegt (54). Rekonstitutionsversuche haben darüberhinaus gezeigt, daß es sich bei dem isolierten Translokator-Protein um das komplette Adenin-Nukleotid-Transportsystem einschließlich der regulatorischen Einheit handelt (61). Somit erscheinen formal die wesentlichen Voraussetzungen für die Durchführung der Bindungs- und Absorptionsstudien am isolierten ANT gegeben.

In den hier gezeigten Ergebnissen traten neben organspezifischen Antikörpern gegen das Herzprotein auch solche auf, die eine Reaktion mit dem ANT von Leber und Niere aufwiesen. Dieses Verhalten der Antikörper deutet auf eine partielle Kreuzreaktion zwischen dem ANT von Herz, Leber und Niere hin, da kreuzreagierende antigene Determinanten vorliegen müssen. So konnte bei Absorptionsversuchen nur der isolierte ANT vom Herz die gesamten Antikörper absorbieren, nicht jedoch der isolierte ANT der Leber. Da in beiden Versuchsansätzen im Sättigungsbereich gearbeitet wurde, konnte somit nachgewiesen werden, daß der ANT der Leber im Verhältnis zum ANT von Herz weniger antigene Determinanten besitzt, welche mit den im Serum enthaltenen Antikörper reagieren. Ein solches Verhalten ist nach Berzofsky (9) als geteilte oder partielle Kreuzantigenität zu bezeichnen.

Absorptionsstudien an Mitochondrien zeigten, daß im Gegensatz zur Absorption am isolierten ANT vom Herz, der sämtliche Antikörper absorbieren kann, bei der Absorption an Herzmitochondrien nur eine Erniedrigung des Antikörpertiters um etwa 50 % zu erreichen ist. Da sowohl bei den Absorptionsversuchen am isolierten Protein als auch an Mitochondrien im Sättigungsbereich gearbeitet wurde, kann die höhere Antikörperabsorption durch das isolierte Protein nicht durch das Anbieten von mehr Antigen bedingt sein. Dieses Ergebnis zeigt, daß am isolierten ANT auch solche antigenen Determinanten für die Antikörper zugänglich sind, die an dem in der mitochondrialen Membran vorliegenden ANT verborgen sind. Allerdings ergab sich auch bei der Absorption an Mitochondrien von Herz und Leber ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Organen in der Absorptionsquote. Somit sind sowohl am isoliertem ANT als auch an dem in der intakten Membran befindlichen ANT organspezifische antigene Determinanten nachweisbar.

Die deutlich hervortretende Organspezifität wirft prinzipiell mehrere Fragen bezüglich der Evolution der Mitochondrien auf. Nach der Endosymbionten-Hypothese (48) wird angenommen, daß die Mitochondrien von Eukaryontenzellen aus Prokaryonten entstanden sind, die eine endosymbiontische Beziehung mit anderen, "proto-eukaryonten" Zellen eingegangen sind. Sie sind deshalb sehr alte Strukturen und in praktisch allen Tierarten gleich. Für diese mangelnde Speziesspezifität spricht auch der Befund, daß es bei Mitochondrien nur zwei Typen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes gibt: Der eine Typ findet sich in gramnegativen Bakterien, während der zweite Typ in den Mitochondrien sämtlicher Säugetiere nachgewiesen werden kann (48). Desgleichen konnte auch keine Speziesspezifität für den ANT nachgewiesen werden (28).

Daneben wurde jedoch von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, daß Mitochondrien, die als einzige Zellbestandteile ein eigenes Genom haben, das nicht im Zellkern lokalisiert ist, ein sehr einfaches und den Erfordernissen der Umwelt sehr angepaßtes Genom besitzen (8,74). Dies ist zum einen durch den nur maternalen Erbgang bei der Weitergabe der genetischen Information der Mitochondrien bei der Bildung der Oocyte, und zum anderen durch einen Mangel an Reparaturmechanismen für das genetisch Material der Mitochondrien im Gegensatz zum Genom der Zelle erklärbar. Dies führt zur Bildung von verhältnismäßig mehr neuen genotypischen Varianten, die aber einem starken Selektionsdruck unterliegen (74). So erscheint es erklärbar, daß die Mitochondrien sich sehr gut an spezifische Anforderungen der verschiedenen Organe angepaßt haben, und somit eine ausgeprägte Organspezifität, bei gleichzeitig nicht vorhandener Speziesspezifität, zeigen. Darüberhinaus ist es nicht überraschend, daß der ANT der Herzzelle, in

der der Energiebedarf vor allem aerob gedeckt wird, sich vom ANT der Leberzelle, in der ein Großteil der Energie anaerob bereitgestellt wird, unterscheidet, obwohl Funktion und Molekulargewicht des Proteins gleich sind. Diese Ergebnisse bezüglich der Organspezifität bei gleichzeitiger partieller Kreuzantigenität bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich der immunochemischen Charakterisierung des ANT (85,87,88,89).

Die Ergebnisse haben darüberhinaus gezeigt, daß bei der alkoholischen Kardiomyopathie (ACM) keine Antikörper gegen den ANT auftreten. Dies kann als weiterer Hinweis dafür gelten, daß die ACM ein eigenständiges Krankheitsbild innerhalb der kongestiven Cardiomyopathien darstellt (26). Diese Ergebnisse deuten zusätzlich darauf hin, daß autoimmunologische Vorgänge bei der ACM nicht wahrscheinlich sind (100).

Ein weiterer wesentlicher Befund ist, daß die Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) keinen spezifischen Antikörpertiter gegen den ANT zeigen. Da sich in diesem Kollektiv auch Patienten mit bereits abgelaufenem Myokardinfarkt befanden, muß angenommen werden, daß das alleinige Vorliegen eines körpereigenen Proteins im für das Immunsystem zugänglichen Raum nicht zu einer Bildung von Autoantikörpern ausreicht. Es scheinen hierfür zusätzliche Mechanismen notwendig zu sein. In der Literatur werden mehrere Faktoren diskutiert, die zur Bildung von Auto-Antikörpern führen können:

Ein wesentlicher Faktor für die Induktion solcher Autoimmunerkrankungen scheinen Virusinfektionen darzustellen (41). Jedoch ist es nicht der Regelfall, daß im Anschluß an eine akute Virusinfektion direkt und sofort eine letale Schädigung des Organismus auftritt, vielmehr entwickelt sich diese erst im Zeitraum von Wochen

bis Monaten im Anschluß an eine (milde) Virusinfektion (73). Es werden dabei mehrere mögliche Mechanismen diskutiert, die zu einer virusbedingten Schädigung des Organismus führen können. Zum einen könnte eine Immunreaktion durch partielle Kreuzantigenität zwischen Virusbestandteilen und normalen Proteinen der Wirtszelle zustande kommen. Für eine solche Vorstellung eines "molekularen Mimicry" sprechen neuere Befunde in der Literatur (33). So wurden u.a. bei der Chagas' Erkrankung Antikörper beschrieben, die sowohl mit Nervenzellen und Herzmuskelzellen als auch mit dem Erreger der Erkrankung kreuzreagieren (51). Im Rahmen einer solchen Kreuzreaktion könnten durch die Immunreaktion im Anschluß an eine Infektion Antikörper entstehen, die an normale Zelloberflächenantigene binden und dadurch z.B. zu einer Änderung der Zellfunktion oder zu einer Zellyse führen. Eine andere denkbare Ursache stellt die Bindung eines "Carrier"-Moleküls an zelleigene Strukturen dar, wobei der Hapten-Protein-Komplex dann als "nicht-eigen" erkannt wird und als Folge Auto-Antikörper nicht nur gegen das Fremdprotein, sondern auch gegen zelleigene Determinanten gebildet werden. Als ein solcher "Carrier" kann z.B. ein Virus fungieren (7,17).

Weiterhin wäre eine Änderung des Immunsystems des Wirtsorganismus durch den Erreger denkbar. Dies könnte z.B. zu einer polyklonalen Stimulation von B-Lymphocyten führen, wodurch es zur Antikörperbildung gegen körpereigene Strukturen käme (30).

Ein weiterer Mechanismus der virusbedingten Autoimmunerkrankung könnte in der Freisetzung von Antigenen, die normalerweise nicht vom Immunsystem der Wirtszelle erkannt werden, bestehen (107).

Einen weiteren Faktor für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung könnte ein primärer Defekt in der zellulären Immunabwehr darstellen

(5). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß bei Patienten mit DCM und MC mehrere Hinweise für eine erniedrigte Aktivität der Suppressor-T-Zellen bestehen (24,31).

Neben den beschriebenen möglichen Mechanismen, die zu einer Induktion von Autoantikörpern führen können, scheinen anlagebedingte Faktoren einen Einfluß auf die Entstehung und Häufigkeit der Autoimmunerkrankungen zu haben. So haben Untersuchungen beim insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IPDM), bei dem autoimmunologische Ursachen angenommen werden, ergeben (46,76), daß Geschwister ein 25fach höheres Risiko haben, daran zu erkranken als der Durchschnitt der Bevölkerung. Darüberhinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen bestimmten Histokompatibilitätsantigenen und dem insulinpflichtigen Diabetes mellitus nachgewiesen. Dies läßt darauf schließen, daß IPDM in Beziehung zu einem oder mehreren Genen auf dem Chromosom 6 in Verbindung mit seinen HLA-Loci steht. Feldstudien von Familien mit mehr als einem Erkrankten haben gezeigt, daß bei Geschwistern mit IPDM 58% die gleichen HLA-Allele haben, 37% haben wenigstens ein elterliches HLA-Allel gemeinsam und nur 5% haben kein gemeinsames, im Gegensatz zur erwarteten Wahrscheinlichkeit von 25:50:25%. Diese Beobachtungen machen eine sehr enge Beziehung zwischen IPDM und Faktoren, die auf dem 6.Chromosom codiert sind, wahrscheinlich.

Neueste Untersuchungen konnten ähnliche Befunde für die DCM und MC nachweisen. So konnte gezeigt werden, daß Patienten mit DCM und MC in einem höheren Prozentsatz als ein Normalkollektiv bestimmte HLA-Gene besitzen, die auf dem Chromosom 6 lokalisiert und mit einer erniedrigten Suppressor-T-Zellaktivität vergesellschaftet sind (25).

Welcher dieser Mechanismen bei der Dilativen Kardiomyopathie bzw. bei

der Myokarditis ausschlaggebend ist, kann nicht entschieden werden. Vielmehr kann es auch zu einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren kommen.

IV.2. Korrelation zwischen Antikörpertiter und klinischem

Schweregrad der Erkrankung

Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich eine lockere Korrelation zwischen dem Antikörpertiter gegen den ANT und der Schwere der Erkrankung. Es war zu sehen, daß Patienten mit einer stark eingeschränkten AF (<40%) im Durchschnitt signifikant höhere Antikörpertiter hatten als die Patienten mit einer gering eingeschränkten AF (40-60%), bzw. noch normaler AF (>60%). Bezüglich der Antikörpertiter ergab sich zwischen den Patienten mit einer AF von 40-60% bzw. einer AF >60% kein signifikanter Unterschied. Ein ähnlicher Befund zeigte sich bei der Messung der Hemmung des Nukleotidtransportes über die innere mitochondriale Membran. Hier hemmen die Seren der Patienten mit einer AF <40% den ADP-Austausch in 100% der Fälle, während bei den Patienten mit einer AF von 40-60% nur etwa 80% der Patienten hemmende Antikörper haben und bei den Patienten mit einer AF >60% dieser Prozentsatz auf etwa 50% absinkt. Darüberhinaus war eine Hemmung des ANT nur an Herzmitochondrien, nicht jedoch an Leber- oder Nierenmitochondrien zu beobachten. Dieser Befund entspricht früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, welche auch für den Translokationsapparat eine Organspezifität zeigten (90). Auffällig ist, daß bei einem Großteil der Seren nur eine maximale

Hemmung des ANT von ca. 50% zu beobachten war. Ein Grund ist wohl darin zu sehen, daß es durch die Dichte des ANT auf der inneren mitochondrialen Membran ($5 \mu\text{mol ANT}/\text{cm}^2$) (54) zu einer gegenseitigen sterischen Behinderung der Antikörper bei ihrer Bindung am ANT kommt.

Als weiterer negativer Faktor bezüglich der Höhe der Hemmung könnte sich außerdem die kurze Inkubationszeit von nur 30 Minuten bei niedriger Temperatur ($+4^\circ\text{C}$) ausgewirkt haben. Wie in der Literatur beschrieben, konnte bei anderen Antikörpern eine Bindung an das Antigen mit konsekutiver Funktionsbeeinflussung durch die Antikörperbindung erst bei sehr viel längerer Inkubation von bis zu 20 Stunden gesehen werden (106). Eine längere Inkubationszeit wäre hier jedoch nicht sinnvoll gewesen, da die Mitochondrienmembran mit zunehmender Versuchslänge geschädigt und damit für ADP durchlässig wird, was zu einer starken, unspezifischen Erhöhung des Nullwertes führen würde.

Ein weiterer Grund für die vermeintlich fehlende Korrelation zwischen der Hemmung des ANT und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung könnte in den verschiedenen, z.T. funktionell aktiven Antikörperpopulationen gegen den ANT liegen, die charakterisiert werden konnten und die z.T. an verschiedenen Bindungsstellen, z.T. aber auch an den gleichen oder überlappenden Bindungsstellen binden und sich dabei gegenseitig behindern bzw. verdrängen können. So finden sich Antikörper, die am ANT nur binden, ohne daß sie eine Hemmung des Nukleotidtransportes bewirken und ohne daß die Bindung von CAT oder BKA blockiert wird. Diese Antikörper binden also weder an der Substratbindungsstelle, noch an der Ligandenbindungsstelle oder am Translokationsapparates. Eine Bindung am Translokationsapparat müßte

zu einer Hemmung des Nukleotidtransportes und zu einer Erniedrigung der BKA-Bindung als Ausdruck einer Hemmung der Konformationsänderung des ANT führen. Die Bindung an der Ligandenbindungsstelle der "c"-Konformation müßte die CAT-Bindung drastisch vermindern, eine Bindung an der Substratbindungsstelle eine deutliche Erniedrigung des Nukleotidtransportes zur Folge haben.

Entsprechend diesen theoretischen Überlegungen konnte eine Antikörperpopulation charakterisiert werden, die am Translokationsapparat selbst band und die Konformationsänderung und damit die Funktion des ANT blockierte. Hierbei wurde jedoch die Ligandenbindungsstelle selbst nicht besetzt, da die Bindung von CAT durch diese Antikörper nicht erniedrigt wurde. Eine dritte Population von Antikörpern band an der Ligandenbindungsstelle selbst, verminderte somit die Bindung von CAT und hemmte die Funktion des ANT. Schließlich konnte noch eine weitere Population von Autoantikörpern nachgewiesen werden. Diese führte zu einem ANT-spezifischen Leakage. Daß dieses Leakage kein allgemeiner Membrandefekt war, sondern am ANT selbst stattfand, konnte dadurch bewiesen werden, daß die Wirkung der Antikörper durch vorherige Zugabe von CAT oder BKA zu den Mitochondrien aufzuheben war.

Daß sich gegenseitig verdrängende Antikörper vorliegen, wird dadurch deutlich, daß es bei einem Teil der Seren durch Verdünnung zu einer Zunahme der hemmenden Wirkung auf den ANT kam. Dieser Effekt kann wohl nur so erklärt werden, daß verschiedene Antikörperpopulationen, die sich in ihrer Bindung gegenseitig beeinflussen und verdrängen, in unterschiedlicher Konzentration und Affinität vorliegen. Hierbei wurden bei niedriger Serumverdünnung die "hemmenden" Antikörper durch hoch konzentrierte, aber niedrig affine Antikörper, welche keine

Hemmung des Nukleotidaustausches bewirkten, verdrängt. Bei zunehmender Verdünnung der Seren und damit verbundener Konzentrationsabnahme der nicht "hemmenden", niedrig affinen Antikörper binden schließlich die höher affinen, aber niedrig konzentrierten "hemmenden" Antikörper. Somit kommt ihre hemmende Wirkung auf den Nukleotidaustausch erst bei hoher Serumverdünnung zum Tragen.

Bei einem anderen Teil der Seren nimmt die Hemmung des ANT jedoch von Anfang an linear mit steigender Verdünnung der Seren ab. Hier liegen entweder nur "hemmende" Antikörper vor, oder diese "hemmenden" Antikörper haben die höchste Affinität und Konzentration von den vorhandenen Antikörpern und werden somit nicht verdrängt.

Eine weitere Beeinflussung der Ergebnisse durch die Wirkung der Antikörper untereinander ist durch das gleichzeitige Vorliegen von solchen Antikörpern, die den Nukleotidaustausch hemmen und solchen, die ein Leakage verursachen, gegeben. Diese beiden Antikörperwirkungen konnten ebenfalls je nach Affinität und Titer der Antikörper in dem gleichen Serum nachgewiesen werden.

Dieses Vorkommen so unterschiedlicher, sich gegenseitig verdrängender Autoantikörper erklärt möglicherweise die bei einem Teil der Patienten fehlende, Antikörper vermittelte Funktionsbeeinflussung des ANT.

IV.3. Bedeutung der Antikörper gegen den ANT bei DCM und MC

Bei mehreren autoimmunologischen Erkrankungen sind Antikörper beschrieben worden, die gegen bestimmte antigene Determinanten der

Zelloberfläche gerichtet sind und die eine funktionelle Bedeutung haben (20,21,30). So wurden beim jugendlichen, insulinpflichtigen Diabetes mellitus Antikörper sowohl gegen die insulinproduzierenden Zellen des Pankreas als auch gegen die Insulinrezeptoren der Zellen beschrieben (76). Funktionell aktive Autoantikörper wurden ebenfalls bei der Immunthyreoiditis (103) und der Myasthenia gravis gefunden (23). Die bei Patienten mit Myasthenia gravis vorkommenden Auto-Antikörper binden an den Acetylcholin-Rezeptor und blockieren diesen. Als Folge davon kommt es zu einer relativen Abnahme von aktiven Rezeptoren für Acetylcholin. Diese Abnahme der Rezeptoren scheint das pathogenetische Prinzip der Myasthenia gravis darzustellen (23).

Es stellt sich natürlich auch bei den von uns gefundenen Antikörpern gegen den ANT bei Patienten mit DCM bzw. MC die Frage, ob diese Antikörper eine funktionelle Bedeutung in der lebenden Myokardzelle haben. In vitro wurde an isolierten Mitochondrien eine Beeinflussung des Nukleotidtransportes über die innere mitochondriale Membran durch diese Antikörper gefunden.

Ob die Antikörper auch in vivo eine funktionelle Bedeutung haben, hängt wesentlich von der Frage ab, ob und wie diese Antikörper in Zellen gelangen können. Mit dieser Frage haben sich schon mehrere Arbeitsgruppen beschäftigt. Die Arbeitsgruppe von Alarcon-Segovia glaubte nachweisen zu können, daß antinukleäre Antikörper in lebende menschliche Monocyten einzudringen vermögen (3,4). Ähnliche Befunde konnten neuerdings auch an Fibroblasten gezeigt werden (32). Für das Einschleusen der Antikörper in die Zelle wird eine Bindung an Fc-Rezeptoren postuliert. Solche Fc-Rezeptoren sind nicht nur an der Oberfläche von Monocyten gefunden worden, sondern auch an

Epithelzellen und Hepatocyten (42), wobei eine Induktion dieser Rezeptoren durch eine Virusinfektion diskutiert wird. Durch eine solche, rezeptorvermittelte Endocytose können prinzipiell nicht nur Antikörper aufgenommen werden, sondern dieser Mechanismus spielt ganz allgemein eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme von größeren Proteinen in die Zelle, wie z.B. Hormonen. Diese rezeptorvermittelte Endocytose ist jedoch nicht der einzige Weg, auf dem Proteine in die Zelle gelangen können. Es sollen hier noch wenigstens zwei andere Mechanismen erwähnt werden: Zum einen können extrazelluläre Proteine nichtselektiv in Flüssigkeitströpfchen eingelagert werden und durch Einscheidung mit Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden. Zum anderen sind z.B. einige bakterielle und pflanzliche Toxine und auch Viren fähig, direkt die Zellwand zu penetrieren (10).

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es durchaus möglich, daß die gefundenen Antikörper in die Myokardzellen gelangen und eine pathogenetische Bedeutung bei der DCM durch eine Hemmung des Adenin-Nukleotid-Transportes über die innere mitochondriale Membran haben. Es könnte dadurch zu einer Verarmung an ATP im Zytosol kommen, was zu einer Einschränkung energiekonsumierender Vorgänge in der Zelle führen müßte. Je nach dem Ausmaß der Störung und den Kompensationsmöglichkeiten wäre eine Funktionseinschränkung, Degeneration oder Funktionsverlust und Untergang der Zelle die Folge. Neueste, noch unveröffentlichte, tierexperimentelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, daß es auch in vivo zu einer Hemmung des ANT kommen kann.

Das Auftreten von annähernd gleichen Antikörpern bei MC und DCM legt die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen nahe. Wie schon erwähnt, haben mehrere Arbeitsgruppen

Hinweise dafür gefunden, daß als Auslöser für eine DCM eine virusinduzierte Myokarditis fungieren könnte (39,43). Die vorliegenden Befunde sprechen ebenfalls dafür, daß es bei entsprechender immunregulatorischer Konstellation im Anschluß an eine Virusmyokarditis zu einer prolongierten und agravierten Immunantwort kommt, die im Sinne einer Autoimmunerkrankung gewertet werden muß. Ein fehlender anamnestischer Hinweis für eine abgelaufene MC bei Patienten mit DCM wäre somit unter Umständen durch eine Virusinfektion mit anschließender MC, welche unbemerkt verlaufen und somit dem Patienten nicht rememberlich ist, zu erklären.

V. Verwendete Abkürzungen

ACM: Kardiomyopathie alkoholtoxischer Genese

ADP: Adenosin-5-diphosphat

AF: Auswurf fraktion

ANT: Adennukleotidtranslokator

ATP: Adenosin-5-triphosphat

AVB: atrioventrikulärer Block

DCM: Dilative Kardiomyopathie

dp/dtmax: maximale Inotropieanstiegsgeschwindigkeit

EDTA: Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz

EGTA: Ethylglykol-bis-essigsäure

EDV: enddiastolisches Volumen

ERS: Erregungsrückbildungsstörungen

HI: Herzindex

HTP: Hydroxylapatit

IF: interstitielle Fibrose

KHK: Koronare Herzkrankheit

KK: Kontrollkollektiv

LSB: Linksschenkelblock

MC: Myokarditis

Mops: Morpholinopropanesulfonic Acid

NHS: Normalhumanserum

RS: Herzrhythmusstörungen

RSB: Rechtsschenkelblock

SMPS: submitochondriale Partikel

Trap: Triäthanolamin-hydrochlorid

Tris: Trishydroxymethylaminomethan

ZI: Zellinfiltrate

ZL: Zelllyse

VI. Literaturverzeichnis:

1. Abelmann W.H., Miklozek C.L., Modlin J.F. The role of viruses in the etiology of congestive cardiomyopathy. In: Congestive Cardiomyopathy (ed.: Goodwin, J.F. e.a.). Lindgren and Söner, Mölndal, Sweden, 76-84 (1981)
2. Abramsky O., Lisak R.P., Silberberg D.H., Pleasure D.H. Antibodies to oligoendroglia in patients with multiple sclerosis. N Engl J Med 297, 1207-1211 (1977)
3. Alarcon-Segovia D. Penetration of antinuclear antibodies into immunoregulatory T cells: pathogenic role in the connective tissue disease Clin Immunol Allerg 1, 117-126 (1981)
4. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Fishbein E. Antibody penetration into living cells. I. Intranuclear immunoglobulin in peripheral blood mononuclear cells in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 35, 364-375 (1979)
5. Anderson J.L., Carlquist J.F., Hammond E.H. Deficient natural killer cell activity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Lancet, 1124-1127 (1982).
6. Aquila H., Eiermann W., Babel W., Klingenberg M. Isolation of the ADP/ATP translocator from beef heart mitochondria as the Bongkrekate-protein complex. Eur. J. Biochem. 85, 549-560 (1978)

7. Bankhurst A.D., Williams R.C. Cellular origins of autoantibody - a perplexing question. *Am. J. Med.* 61, 303-307 (1976)
8. Barton N., Jones J.S. Mitochondrial DNA: new clues about evolution. *Nature* 306, 317-318 (1983)
9. Berzofsky J.A., Schechter N. The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Molec Immunol* 18, 751-763 (1981)
10. Bestermann J.M., Low R.B. Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochem. J.* 210, 1-13 (1983)
11. Bode C., Goebell H., Stähler E. Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* 6, 418-422 (1968)
12. Bolte H.-D. Virale Herzerkrankung, Symptomatologie, klinische Diagnostik und Hämodynamik. *Z. Kardiologie* 72 (Suppl), 33 (1983)
13. Bolte H.-D., Schultheiss H.-P. Immunological results in myocardial disease. *Postgrad Med J* 54, 500-503 (1978)
14. Bolte H.-D., Schultheiss H.-P., Fischer S., Gross F., Cyran J. Dilated cardiomyopathies: the ejection fraction related to immunoglobulin binding and lactate dehydrogenase isoenzymes in myocardial biopsies. In: *Congestive Cardiomyopathy* (ed.: Goodwin, J.F. e.a.), Lindgren and Söner, Mölndal, Sweden, 431-483 (1981)

15. Boxer D.H. The location of the major polypeptide of the ox heart mitochondrial inner membrane. FEBS Lett 59, 149-152 (1975)
16. Boxer D.H., Feckl H., Klingenberg M. Identity between the major protein located at the outer face of the inner mitochondrial membrane and the carboxyatractylate binding protein. FEBS Lett 73, 43-46 (1976)
17. Cahill G.F., McDevitt H.O. Insulin-dependent diabetes mellitus: the initial lesion. New Engl.J. Med. 304, 1454-1464 (1981)
18. Cambridge G., MacArthur C.G.C., Waterson A.P., Goodwin J.F., Oakley C.M. Antibodies to Coxsackie B virus in congestive cardiomyopathy. Br Heart J 41, 692-696 (1979)
19. Das S.K., Stein L.D., Reynolds R.T., Thebert P., Cassidy J.T. Immunologic studies in cardiomyopathy and pathophysiologic implications. In: Congestive Cardiomyopathy (ed.: Goodwin, J.F.), Lindgren and Söner, Mölndal Sweden, 87-93 (1981)
20. Dighiero G., Guilbert B., Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. J. Immunol. 128, 2788-2792 (1982)
21. Dobersen M.J., Scharff J.E., Ginsberg-Fellner F., Notkins A.L. Cytotoxic autoantibodies to beta cells in the serum of patients with insulindependent diabetes mellitus. N Engl J Med 303, 1493-1498 (1980)
22. Douglas M., Finkelstein D., Butow R.A. Analysis of products of mitochondrial protein synthesis in yeast: genetic and biochemical aspects.

Meth. Enzymol. 56, 58-66 (1979)

23. Drachman D.B., Adams R.N., Josifek L.F., Self S.G. Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of the myasthenia gravis. *N Engl J Med* 307, 769-775 (1982)
24. Eckstein R., Mempel W., Bolte H.-D. Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and in myocarditis. *Circulation* 65, 1224-1229 (1982)
25. Eckstein R., Mempel W., Heim M., Bolte H.-D. The role of human leucocyte antigen genes and low suppressor cell activity in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. in: *Viral heart disease* (ed.: Bolte, H.-D.), Springer 151-161 (1984)
26. Editorial: Alcoholic heart disease. *Lancet* 961 (1980)
27. Editorial: Virus, immunology and the heart. *Lancet* 1111-1113 (1979)
28. Eiermann W., Aquila H., Klingenberg M. Immunological characterization of the ADP, ATP translocator protein isolated from mitochondria of liver, heart and other organs. *FEBS Lett* 74, 209-214 (1977)
29. Engblom E., Ekfors Z., Meurmann O. Fatal influenza a myocarditis with isolation of virus from the myocardium. *Acta Med. Scand.* 213, 75-78 (1983)

30. Fauci A.S. Activation and regulation of human immune responses: Implications in normal and disease states. *Ann. Int. Med.* 99, 61-75 (1983)
31. Fowles R.E., Bieber C.P., Stinson E.B. Defective in vitro cell function in idiopathic congestive cardiomyopathy. *Circulation* 59, 483-491 (1979)
32. Frey J., Einsfelder B. Induction of surface IgG receptors in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 138, 213-216 (1984)
33. Fujinami R.S., Oldstone M.B.A., Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80, 2346-2350 (1983)
34. Fuster V., Gersh B.J., Guiliani E.R., Tajik A.J., Brandenburg R.O., Freye R.L. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 47, 525-531 (1981)
35. Goding J.W. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immun. Meth.* 20, 241-253 (1978)
36. Goodwin J.F. The frontiers of cardiomyopathy. *Br Heart J* 48,1-18 (1982)
37. Goodwin J.F., Oakley C.M. Editorial: the cardiomyopathies. *Br. Heart J.* 34, 545-552 (1976)
38. Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279, 679-685 (1979)

39. Grist N.R., Bell E.J. Coxsackie ciruses and the heart. Editorial Am. Heart J. 77, 295-300 (1969)
40. Hackenberg H., Klingenberg M. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the Adenosine 5'-Diphosphate-Adenosine 5'-Triphosphate carrier in Triton X-100. Biochemistry 19, 548-555 (1980)
41. Haspel M.V., Onodera T., Suzuki H., Notkin A.L. Virus-induced autoimmunity: Monoclonal antibodies that react with endocrine tissues. Science 220, 304-306 (1983)
42. Hopf U., Meyer zum Bürschenfelde K.H., Dierich M.P. Demonstration of binding sites for IgG Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes. J. Immunol. 117, 639-645 (1976)
43. James T.N. Myocarditis and Cardiomyopathy. N Engl J Med 308 39-41 (1983)
44. Johnson R.A., Palacios I. Dilated cardiomyopathies of the adult. N Eng J of Med 307, 1051-1058 (1982)
45. Johnson R.A., Palacios I. Dilated cardiomyopathies of the adult. N Eng J of Med 307, 1119-1126 (1982)
46. Kahn R.C. Autoantibodies to the insulin receptor: clinical and molecular aspects. Fed. Proced. 38, 2607-2609 (1979)

47. Kawai C, Matsumori A, Kitauro Y, Takatsu T. Viruses and the heart: viral myocarditis and cardiomyopathy. *Prog. Cardiol.* 7, 141-162 (1980)
48. Keha E.E., Ronft H., Kresze G.B. On the origin of mitochondria: a reexamination of the molecular structure and kinetic properties of pyruvate dehydrogenase complex from brewer's yeast. *FEBS Letters* 145, 289-292 (1982)
49. Kessler S.W. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol*, 115, 1617-1624 (1975)
50. Kessler S.W. Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A-antibody adsorbent. *J Immunol* 117, 1482-1490 (1976)
51. Khoury E.L., Ritacco V., Cossio P.M., Laguens R.P., Arana M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. exp. Immunol.* 36, 8-15 (1979)
52. Kirsner A.B., Hess E. V., Fowler N.O. Immunological findings in idiopathic cardiomyopathy: a prospective serial study. *Am. Heart J.* 86, 625-630 (1973)
53. Klingenberg M. The adenine-nucleotide exchange in submitochondrial (sonic) particles. *Eur. J. Biochem.* 76, 553-565 (1977)
54. Klingenberg M. The ADP-ATP carrier in mitochondrial membranes. The

Enzymes of Biological Membranes (ed.: Martonossi, A.), Plenum Publishing Corporation, New York, zweite Auflage, im Druck (1984)

55. Klingenberg M. The ADP-ATP carrier in mitochondrial membranes. The Enzymes of Biological Membranes (ed.: Martonosi, A.). Plenum Publishing Corporation, New York, vol 3, 383-438 (1976)
56. Klingenberg M., Appel M., Babel W., Aquila H. The binding of Bongkrekate to mitochondria. Eur. J. Biochem. 131, 647-654 (1983)
57. Klingenberg M., Aquila H., Riccio P. Isolation of functional membrane proteins related to or identical with the ADP/ATP carrier of mitochondria. Meth. Enzym. 56, 407-414 (1979)
58. Klingenberg M., Grebe K., Appel M. Temperature dependence of ADP/ATP Translocation in mitochondria. Eur. J. Biochem. 126, 263-269 (1982)
59. Klingenberg M., Riccio P., Aquila H. Isolation of the ADP/ATP carrier as the carboxyatractylate-protein complex from mitochondria. Biochim Biophys Acta 503, 193-210 (1978)
60. Klingenberg M., Heldt H.W. The ADP/ATP translocation in mitochondria and its role in intracellular compartmentation. In.: Metabolic Compartmentation (ed.: Sies, H.). Academic Press, London, 101-122 (1982)
61. Krämer R. Interaction of membrane surface charges with the reconstituted ADP/ATP carrier from mitochondria. Biochem. Biophys. Acta 735, 145-159 (1983)

62. Krämer R., Klingenberg M. Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry*, 19, 556-560 (1980)
63. Krämer R., Klingenberg M. Electrophoretic control of reconstituted nucleotide translocation. *Biochemistry*, 21, 1082-1089 (1980)
64. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1979)
65. Langone J.J. Protein A: A tracer for general use in immunoassay. *J. Immu. Meth.* 24, 269-285 (1978)
66. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951)
67. Lowry P.J., Edwards C.W., Nagle R.E. Herpes-like virus particles in myocardium of patient progressing to congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 48, 501-503 (1982)
68. McNemar Q. *Psychological statistics*. 4. Auflage, Wiley, N. York (1969)
69. Maisch B. Humorale immunologische Effektormechanismen bei Perimyokarditis. *Z. Cardiol.* 72 (Supp), 33 (1983)
70. Maisch B., Berg P.A., Kochsiek K. Immunological parameters in patients with congestive cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* 75, 221-222 (1980)

71. Maisch B., Deeg P., Liebau G., Kochsiek K. Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 52, 1072-1078 (1983)
72. Matsumori, A., Kawai C. An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: Dilatation and hypertrophy of the heart in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation* 66, 355-360 (1982)
73. Oldstone M.B.A., Rodrigues M., Daughaday W.H., Lampert P.W. Viral perturbation of endocrine function: disordered cell function leads to disturbed homeostasis and disease. *Nature* 307, 278-281 (1984)
74. Olivio P.D., Van de Walle M.J., Laipis P.J., Hauswirth W.W. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306, 400-402 (1983)
75. Olsen E.G.J. Myocarditis - a case of mistaken identity ? *Br Heart J* 50, 303-311 (1983)
76. Onodera T., Toniolo A., Ray U.R., Jenson A.B., Knazek R.A., Notkins A.L. Virus-induced diabetes mellitus. *J. exp. Med.* 153, 1457-1473 (1981)
77. Palmieri F., Klingenberg M. Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria. *Methods in Enzymology* Academic Press, New York, San Francisco, London 56, 279-301 (1979)

78. Pfaff E., Klingenberg M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur J Biochem* 6, 66-79 (1968)
79. Regitz V., Knoll P., Rudolph W. Histologisch nachgewiesene Myokarditiden bei Patienten mit dem Bild einer Dilativen Kardiomyopathie *Z. Kardiol.* 73 (Supp), 19 (1984)
80. Report of the WHO/ISFS task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44, 672-673 (1980)
81. Riccio P., Aquila H., Klingenberg M. Solubilization of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* 56, 129-132 (1975)
82. Riccio P., Aquila H., Klingenberg M. Purification of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* 56, 133-138 (1975)
83. Sachs L. *Angewandte Statistik.* Springer-Verlag (1974)
84. Saffitz J.E., Schwartz D.J., Southworth W., Murphree S., Rodriguez E.R., Ferrans V.J., Roberts W.C. Coxsackie viral myocarditis causing transmural right and left ventricular infarction without coronary narrowing. *Am J Cardiol* 52, 644-647 (1983)
85. Schultheiss H.-P., Bjerrum O.J., Klingenberg M. A detergent-induced charge shift as a prerequisite for the electrochemical analysis of the adenine nucleotide translocator, a basic membrane protein. *Biochim*

Biophys Acta 771, 235-240 (1984)

86. Schultheiss, H.-P., Bolte, H.-D., Schwimmbeck, P. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organspecific autoantibodies in myocarditis and congestive cardiomyopathy, *Circulation* 68, III-336 (1983)
87. Schultheiss H.-P., Klingenberg M. Immuno-electrophoretic characterization of the ADP/ATP carrier from heart, kidney and liver. *Archives of Biochemistry* (1984), im Druck
88. Schultheiss H.-P., Klingenberg M. Der ADP/ATP-Carrier der Mitochondrien als organspezifisches Antigen bei Autoimmunerkrankungen. *Verh. Dt. Gesellsch. Inn. Med.* 87, 1145 (1981)
89. Schultheiss H.-P., Klingenberg M. Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator: organ- and conformation-specificity. *Eur. J. Biochem.* im Druck (1984)
90. Schultheiss H.-P., Klingenberg M. Organ- and conformation specificity of the adenine nucleotide translocator. *Second Eur. Bioenerg. Conf., short reports* 471 (1982)
91. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Berg, P.A. Charakterisierung verschiedener, funktionell aktiver Autoantikörper gegen den Adenin-Nukleotid-Translokator bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC). *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med* 90, 1511 (1984)

92. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Berg, P.A. The biochemical characterisation of auto-antibodies against the adenine-nucleotide-translocator. Third Eur. Bioenerg. Conf., short reports, 453 (1984)
93. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Berg, P., Klingenberg, M. Hemmung des Adenin-Nukleotid-Transportes durch organspezifische Antikörper bei der primär biliären Zirrhose. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 89, 752-756 (1983)
94. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D. Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) als organspezifisches Antigen bei Myokarditis. Z. Kardiol. 72 (Supp.), 7 (1983)
95. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D. Hemmung des Adenin-Nukleotid-Transportes durch organ- und konformationsspezifische Auto-Antikörper bei Patienten mit Dilativer Cardiomyopathie. Z. Kardiologie, 73 (Supp.), 20 (1984)
96. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., Berg, P. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organspecific auto-antibodies in primary biliary cirrhosis (PBC). Progress in Immunology V, Congress Proceedings of the 5th International Congress in Immunology, in Druck (1984)
97. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., Berg, P. Autoantibodies against the adenine nucleotide translocator in myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Viral Heart Disease, (ed.: Bolte, H.-D.) Springer Verlag, 131-143 (1984)

98. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., Klingenberg, M. The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator as a major autoantigen to anti-mitochondrial antibodies in dilated cardiomyopathy. In: *Advances in Myocardiology*, vol. 6 (eds.: Dhalla, N.S. and Hearse, D.), Plenum Press, in Druck (1984)
99. Schultheiss, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., Klingenberg, M. The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator (ANT) as a major autoantigen to anti-mitochondrial antibodies in myocarditis (MC) and congestive cardiomyopathy (CCM). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15, 85 (1983)
100. Segel L.D., Rendig S.V., Mason D.T. Alcohol-induced cardiac hemodynamic and Ca flux dysfunction are reversible. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13, 443-455 (1981)
101. Smith A.D. Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small scale. *Methods in Enzymology* Academic Press, New York, San Francisco, London 81-86 (1967)
102. Steinberg A.D. Aetiology of autoimmunity. *Nature* 304, 20 (1983)
103. Strackosch C., R., Wenzel B.E., Row V.V., Volpe R. Immunology of autoimmune thyroid disease. *N Engl J Med* 307, 1449-1507 (1982)
104. Student. Errors of routine analysis. *Biometrika* 19, 151-160 (1927)

105. Vignais P.V. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 456, 1-38 (1976)
106. Vincent A., Newsom-Davis J. Acetylcholin receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. *Clin. exp. Immunol* 49, 266-272 (1982)
107. Wekerle H. Zelluläre Grundlagen und Therapie der immunologischen Autoaggression. *Autoimmunität*, Springer-Verlag 111-115 (1979)
108. Woodruff J.F. Viral myocarditis. *Am J Pathol* 101, 425-484 (1980)
109. Zollinger W.D., Dalrymple J.M., Artenstein M.S. Analysis of parameters affecting the solid phase radioimmunoassay quantitation of antibody to meningococcal antigens. *J Immunol* 117, 1788-1898 (1976)

VII. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob bei 17 Patienten mit Myokarditis (MC) und 25 Patienten mit Dilativer Kardiomyopathie (DCM) im Serum Autoantikörper gegen den Adeninnukleotidtranslokator (ANT) der inneren mitochondrialen Membran vorkommen, und ob diese Autoantikörper zu einer funktionellen Beeinträchtigung des ANT in vitro führen. Die Charakterisierung der Autoantikörper erfolgte durch einen Solid-phase-radioimmunoassay, Absorptions- und Bindungsstudien, sowie durch die Messung des Adeninnukleotidtransportes an Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln.

Sowohl bei der MC als auch bei der DCM konnte ein signifikanter Antikörpertiter gegen den ANT des Herzens nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, alkoholischer Kardiomyopathie oder gesunden Blutspendern. Die organ- und konformationsspezifischen Autoantikörper führten zu einer Hemmung des Nukleotidtransportes an Mitochondrien, inhibierten die Bindung spezifischer Liganden am ANT und verursachten z.T. einen translokatorspezifischen lytischen Effekt an Mitochondrien.

Der Nachweis von krankheitsspezifischen Autoantikörpern gegen den ANT deutet auf autoimmunologische Vorgänge bei der MC und DCM hin und kann als weiterer Hinweis für einen gemeinsamen pathophysiologischen Hintergrund beider Erkrankungen angesehen werden. Durch die Bestimmung der Antikörpertiter und ihrer funktionellen Aktivität ergibt sich die Möglichkeit, eine Aussage über die Aktivität der Erkrankung und deren Prognose zu machen.

Lebenslauf

geboren: 02. Dezember 1958 in Armannsberg, Landkreis
Landshut, als Sohn des Landwirtes Andreas
Schwimmbeck und seiner Ehefrau Maria, geb.
Hörmannskirchner

9/65 - 8/69 Besuch der Grundschule in Geisenhausen

9/69 - 6/78 Besuch des Josef-Hofmiller-Gymnasiums in
Freising

29. 6. 1978 Abitur

11/78 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

8/80 Ärztliche Vorprüfung

8/81 1. Teil der Ärztlichen Prüfung

8/83 2. Teil der Ärztlichen Prüfung

31.10.84 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

6.11.84 Approbation als Arzt

seit 1.12.84 Assistent der Medizinischen Klinik I der
Universität München am Klinikum Großhadern
(Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. H.-P. Schultheiß für die Überlassung des Themas und die stets engagierte und interessierte Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen und Anfertigung des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. med. H.-D. Bolte, jetzt Chefarzt der 1. Medizinischen Klinik am Zentralklinikum Augsburg, in dessen Arbeitsgruppe die Untersuchungen gemacht wurden, der die Myokardbiopsien und Untersuchungen der Ventrikelhämodynamik durchgeführt hatte und wertvolle Verbesserungsvorschläge bei der Abfassung der Arbeit gab.

Für die Durchführung der histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung der Myokardbiopsien möchte ich Herrn Professor Dr. med. G. Hübner, München, und Herrn Professor Dr. med. E.C.J. Olson, London, danken.

Desweiteren bin ich Fräulein Elisabeth Ronft dankbar für ihre Mithilfe beim Tippen der Arbeit und Frau Vida Holtzmann für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen, sowie allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik I, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

